

**Veränderungen der axonalen Erregbarkeit peripherer
Nerven bei
Hereditärer Spastischer Spinalparalyse**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Anne Gunkel

geboren am 23.05.1989 in Bad Salzungen

Gutachter

- 1. PD Dr. med. Julian Großkreutz, Klinik für Neurologie, Jena**
- 2. PD Dr. med. Albrecht Waschke, Klinik für Neurochirurgie, Jena**
- 3. Univ. Prof. Dr. med. Wolfgang Löscher, Universitätsklinik für Neurologie, Innsbruck**

Tag der öffentlichen Verteidigung: 15.10.2019

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	06
Zusammenfassung	08
Dissertation	10
1. Einleitung	10
1.1 Hereditäre Spastische Spinalparalyse	10
1.1.1 Genetische Grundlagen der Hereditären Spastischen Spinalparalyse .	11
1.1.2 Pathophysiologie der Hereditären Spastischen Spinalparalyse	14
1.2 Physiologie des peripheren Nerven	15
1.2.1 Elektrophysiologische Grundlagen	15
1.2.2 Verteilung der Ionenkanäle	18
1.2.3 Na ⁺ -Kanäle	19
1.2.4 K ⁺ -Kanäle	21
1.3 Threshold Tracking	22
1.3.1 Strength-duration relationship	24
1.3.2 Threshold electrotonus	26
1.3.3 Current threshold relationship	28
1.3.4 Recovery cycle	29
2. Ziele der Arbeit	32
3. Methodik	33
3.1 Probanden	33
3.2 Scores	34
3.2.1 Spastic paraplegia rating scale (SPRS)	34
3.2.2 Fragebogen zum Ausschluss relevanter Kontraindikationen	35
3.3 Technische Voraussetzungen	35
3.3.1 DS5 Isolated Bipolar Constant Current Stimulator	36
3.3.2 Qtrac®-Software	36
3.4. Messaufbau und-ablauf	37
3.4.1 Messaufbau	37
3.4.2 Messablauf	38

3.4.3 Messprotokoll.	39
3.5. Statistische Auswertung	40
3.5.1 Zusammenhang mit der Krankheitsschwere	40
4. Ergebnisse	42
4.1 Veränderungen der axonalen Erregbarkeit der Gesamtpopulation	42
4.1.1 Strength-duration relationship	42
4.1.2 Threshold electrotonus	43
4.1.3 Current threshold relationship	45
4.1.4 Recovery cycle	46
4.2 Veränderungen der axonalen Erregbarkeit bei SPG4-HSP	47
4.2.1 Vergleich SPG4-HSP gegen Kontrollen	47
4.2.2 Vergleich SPG4-HSP gegen Nicht-SPG4-HSP	48
4.2.3 Vergleich der Nicht-SPG4-HSP gegen Kontrollen	50
4.3 Zusammenhang zwischen Krankheitsschwere und Messparametern des TT ...	51
5. Diskussion	52
5.1 Veränderungen der axonalen Erregbarkeit	52
5.1.1 Strength-duration relationship	52
5.1.2 Threshold electrotonus	53
5.1.3 Current threshold relationship	54
5.1.4 Recovery cycle	55
5.1.5 Zusammenschau der Veränderungen auf Ionenkanalebene	55
5.2 Korrelation mit der Krankheitsschwere	56
5.3 Diskussion der Methode	57
6. Schlussfolgerung	60
7. Literaturverzeichnis	62
8. Anhang	67
8.1 Studienunterlagen	67
8.1.1 Teilnehmerinformation und Aufklärung	67
8.1.2 Einverständniserklärung	69

8.2 Fragebögen	70
8.2.1 Fragebogen für Teilnehmer	70
8.2.2 Spastic Paraplegia Rating Scale	71
Danksagung	74
Ehrenwörtliche Erklärung	75

Abkürzungsverzeichnis

AAA	ATPase associated with diverse cellular activities
Abb.	Abbildung
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
AP	Aktionspotential
ATP	Adenosintriphosphat
EQ5D	EuroQol 5D
HSP	Hereditäre spastische Spinalparalyse
Na _p	persistenter Natrium-Kanal
Na _t	transienter Natrium-Kanal
I _h	HCN (hyperpolarization-activated cyclicnucleotide-gated cation channel); Einwärtsgleichrichter
IV	current-threshold relationship
K ⁺	Kalium
K _f	schneller Kaliumkanal
K _s	langsamer Kaliumkanal
K _v	spannungsabhängiger Kalium-Kanal
M.	Musculus
MW	Mittelwert
N.	Nervus
Na ⁺	Natrium
Na _v	spannungsabhängiger Natrium-Kanal
RC	Recovery cycle
RMP	Ruhemembranpotential
SD	Standardabweichung
SPG	Spastic-paraplegia Gene

SPRS	Spastic Paraplegia Rating Scale
Tab.	Tabelle
TE	Threshold electrotonus
TR	Threshold reduction
TSD	Strength-duration time constant
TT	Threshold tracking
ZNS	Zentrales Nervensystem

Zusammenfassung

Durch zunehmende Fortschritte in den Sequenzierungstechniken konnte in den letzten Jahren ein enormer Zuwachs an Wissen über die hereditäre spastische Spinalparalyse (HSP) verzeichnet werden. Hierbei liegt jedoch ein deutlicher Schwerpunkt auf der Identifizierung neuer Mutationen und Genloci sowie der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen. Über Veränderungen auf neuronaler Ebene, welche sich nicht allein durch eine selektive Vulnerabilität der Betz-Zellen und der Pyramidenbahn im Rahmen der HSP erklären lassen, sondern eine Beteiligung des peripheren Nervensystems nahe legen, ist wenig bekannt. Threshold Tracking (TT) ermöglicht durch kontinuierliche Bestimmungen der elektrischen Erregbarkeit des peripheren Nervs die nichtinvasive in vivo Testung der axonalen Membranfunktion und gewährt Rückschlüsse auf die Ionenkanalebene.

Ziel dieser Arbeit war es, Einblicke in die Veränderungen der Ionenkanalleitfähigkeit und somit der axonalen Erregbarkeit, am Beispiel des N. medianus, im Rahmen der HSP zu erlangen. Dazu wurden TT-Messungen am N. medianus von 26 Probanden mit bekannter HSP und 21 gesunden Kontrollpersonen aufgezeichnet. Zudem wurde zur Beurteilung der Krankheitsschwere der untersuchten Probanden die Hereditary Spastic Paraplegia Rating Scale erhoben. Unter rechnerischer Kompensation von Alters-, Temperatur- und Geschlechtsunterschieden erfolgte die Datenanalyse.

Es konnte gezeigt werden, dass bei Probanden mit HSP eine gesteigerte nodale Na_p -Leitfähigkeit sowie eine Verminderung der internodalen K_s -Leitfähigkeit und paranodaler K_f -Kanal-Aktivität eine wichtige Rolle für die axonale Erregbarkeit peripherer Nervenmembranen zu spielen scheinen. Zudem war auffällig, dass Veränderungen der axonalen Erregbarkeit als Ausdruck einer progredienten axonalen Degeneration mit begleitender Veränderung der nervalen Struktur nicht nur im Vergleich der Probanden und Kontrollen nachweisbar waren, sondern dass es sich hier insbesondere um einen durch die SPG4-positive Probandengruppe verursachten Effekt handelt. Dies legt nahe, dass die nachgewiesenen Veränderungen vor allem durch Pathologien im SPAST-Gen induziert oder durch solche stärker ausgeprägt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit untermauern zum einen die Vorstellung, dass trotz einer primären Affektion des ersten Motoneurons im Rahmen der HSP eine Beteiligung

des peripheren Nervensystems vorliegt. Das TT stellte sich hierbei als geeignete Messmethode zur Beurteilung der Membraneigenschaften und Ionenkanalfunktion am humanen peripheren Nerven dar. Zusätzlich scheint sich die bekannte phäno- und genotypische Variabilität der Erkrankung auch auf pathophysiologischer Ebene fortzusetzen. Aufgrund dessen sind weiterführende Untersuchungen mit Schwerpunkt auf verschiedenen definierten Genotypen erstrebenswert, um die zu vermutende Variabilität auf axonaler Ebene nachzuweisen und perspektivisch, entsprechend der speziellen zugrunde liegenden Pathologie, patientenorientierte therapeutische Optionen zu entwickeln und auszubauen.

1. Einleitung

1.1 Hereditäre Spastische Spinalparalyse

Die HSP ist eine genetisch bedingte, neurologische Erkrankung, die durch eine progrediente axonale Degeneration des oberen Motoneurons charakterisiert ist (Salinas et al. 2008). In den wenigen dokumentierten Post-Mortem-Untersuchungen war, neben einer retrograden Degeneration der Pyramidenbahn mit Betonung des thorakalen Myelons, auch die Degeneration der Axone des Faszikulus gracilis, insbesondere im Zervikalmark, objektivierbar. Zudem wird auch eine Reduktion der Betzschen Riesenzellen im primär motorischen Kortex sowie eine Ausdehnung der neurodegenerativen Prozesse nach rostral mit Affektion von Pons, Medulla oblongata sowie der Capsula interna beschrieben (Salinas et al. 2008, Fink 2013). Die ersten Erwähnungen der spastischen Spinalparalyse als eigenständiges Krankheitsbild mit Diskussion einer möglichen hereditären Komponente erfolgten bereits im 19. Jahrhundert durch Strümpell und Erb (Reid 1997, Erb 1877, Erb 1903). Die Prävalenz der Erkrankung wird mit einer relativ großen Spanne von 3-10/100.000 in Europa angegeben (McMonagle et al. 2002, Silva et al. 1997, Erichsen et al. 2009, Brachinsky et al. 2009, Orsucci et al. 2014). Sie kann zwischen dem frühen Kindesalter bis hin zum späten Erwachsenenalter manifest werden. In der Regel geht die HSP nicht mit einer Verkürzung der Lebenszeit einher (Salinas et al. 2008). Entsprechend der zugrunde liegenden Pathologie mit Untergang der Axone des pyramidalen Systems präsentiert sich die HSP klinisch mit einer progredienten Spastik, betont der unteren Extremität, einer Hyperreflexie sowie positiven Pyramidenbahnzeichen (Salinas et al. 2008, Fink 2013). Die ersten Hinweise auf eine beginnende spastische Tonuserhöhung sind insbesondere im Bereich der Adduktoren erkennbar (Tesson et al. 2015).

Die HSP wird, abhängig von begleitenden neurologischen Defiziten, in reine und komplexe Formen unterteilt. Die reinen Formen sind neben den oben genannten Symptomen durch eine langsam progrediente, distal betonte muskuläre Schwäche sowie Blasenfunktionsstörungen auf Basis einer hypertonen Blase charakterisiert. Zusätzlich sind auch leichte Sensibilitätsdefizite, wie eine Reduktion der Pallästhesie und Propriozeption, möglich. Die komplexen Formen zeichnen sich durch zusätzliche Symptome wie Dysarthrie, zerebelläre Ataxie, Retinopathie, Optikusatrophie, Polyneuropathie, Taubheit, kognitive Defizite, dementielle Entwicklung, Epilepsie und

Ichthyosis aus. Darüber hinaus sind bildmorphologisch Atrophien des Corpus callosum sowie des Zerebellums beschrieben (Salinas et al. 2008). Perspektivisch ist, aufgrund der sich zunehmend herauskristallisierenden Phänotyp-Genotyp-Variabilität und damit unzureichenden Korrelation der herkömmlichen Unterteilung mit den genetischen Grundlagen, eine neue Nosologie notwendig (Yoon et al. 2013, Tesson et al. 2015). In Anbetracht der enormen Variabilität der spastischen Spinalparalysen stellen sich differentialdiagnostische Überlegungen schwierig dar. Je nach klinischem Bild sollten neben strukturellen Anomalien und Traumata auch autoimmune (z.B. Multiple Sklerose), infektiöse (z.B. Neurolues, AIDS, Neuroborreliose), metabolische (z.B. Adrenoleukodystrophie, Morbus Wilson) und toxische (z.B. Schwermetalle) Ursachen berücksichtigt werden. Zudem sind auch erworbene (z.B. infantile Zerebralparese) und andere neurodegenerative Erkrankungen wie ALS, primäre Lateralsklerose oder spinocerebelläre Ataxien zu diskutieren (Tesson et al. 2015). Kurative Therapien sind bis zum heutigen Tag nicht verfügbar, sodass die Behandlungsschwerpunkte auf physiotherapeutische und rehabilitative Maßnahmen, Hilfsmittelversorgung sowie symptomatische antispastische Therapie gelegt werden (Fink et al. 2013, Tesson et al. 2015).

1.1.1 Genetische Grundlagen der Hereditären Spastischen Spinalparalyse

Ebenso heterogen wie das klinische Bild stellen sich die genetischen Grundlagen der HSP dar. Allein zwischen 2013 und 2014 konnten, aufgrund enormer Fortschritte in den Sequenzierungstechniken, 25 neue ursächliche Gene detektiert werden. Diese Gene werden als „spastic paraplegia gene“ (SPG) bezeichnet und fortlaufend nach der Reihenfolge ihrer Entdeckung nummeriert (Tesson et al. 2015). Aktuell sind 78 SPG-Gene und mehr als 67 HSP-assoziierte Gene und Genloci, deren Mutation zur Erkrankung führen kann, identifiziert; weitere folgen regelmäßig (Tesson et al. 2015, Wang und Zhao 2015, Estrada-Cuzcano et al. 2017, Dong et al. 2018). Neben der autosomal-dominanten (AD-HSP) und der autosomal-rezessiven (AR-HSP) Vererbungsform treten auch seltene x-chromosomale Erbgänge sowie die maternale Vererbung im Rahmen mitochondrialer Mutationen auf (Fink 2013, Finsterer et al. 2012). Bei den bisher erhobenen Häufigkeitsangaben für Vererbungswege und Mutationen der HSP ist zu beachten, dass circa 50% aller anamnestisch vermuteten autosomal-dominanten HSP-Patienten sowie circa 70% aller anamnestisch

autosomal-rezessiven HSP-Patienten keiner genetischen Testung unterzogen wurden (Ruano et al. 2014). Die überwiegend nachgewiesenen Mutationen im Rahmen einer HSP sind in Abb. 1 dargestellt.

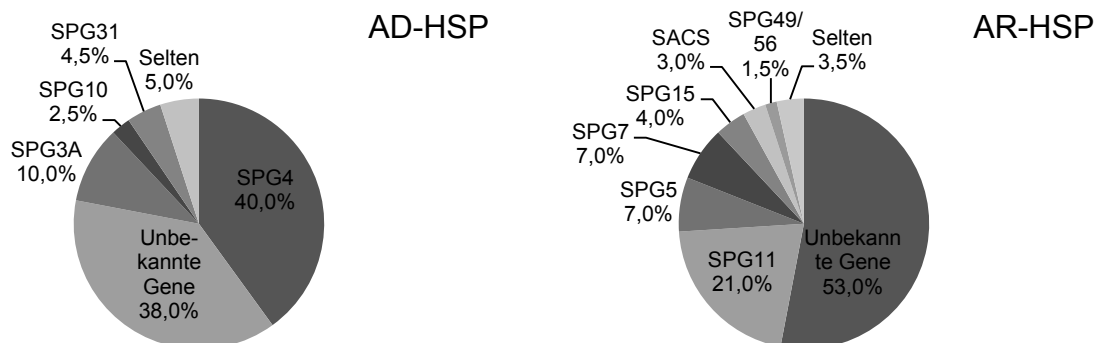


Abb. 1: Relative Häufigkeit der verschiedenen AD-HSP und AR-HSP Mutationen (modifiziert nach Tesson et al. 2015)

Die häufigste im Patientenkollektiv dieser Studie vertretene Mutation (SPG4) ist in Tab. 1 zusammengefasst.

Häufigkeit bei familiärer HSP	40 – 68,8% Häufigste Variante familiärer AD-HSP (Magariello et al. 2006, Orsucci et al. 2014)
Häufigkeit bei sporadischer HSP	7,4 -20% (Magariello et al. 2006, Orsucci et al. 2014)
Geschlechtsverteilung	M > W, Betonung der klinischen Symptome bei männlichen Patienten (Proukakis et al. 2011)
Genprodukt	Spastin (AAA-Protein-Familie) bestehend aus N- und C-Terminus
Mechanismus	1) 50% Deletion und Duplikation (Beetz et al. 2006) 2) Ausschließlich AAA-katalysierende-Domäne über loss-of-function Mechanismus (Haploinsuffizienz) betroffen (Guidice et al. 2014) 3) Reduzierte Spastin-Aktivität mit Veränderung der Mikrotubuli-Dynamik (Solowska und Baas 2015) 4) Veränderung neuronale Morphologie mit gestörter synaptischer Plastizität und Regenerationskapazität, Schädigung des axonalen Transport (Dubey et al. 2015)

Tab. 1: SPG4 im Überblick

Eine klare Genotyp-Phänotyp-Korrelation ist bei der HSP nicht möglich, da es auch innerhalb von Familien mit identischer Genetik zu starken Variationen des Phänotyps, von klinisch asymptomatischen bis hin zu schwer betroffenen Patienten, kommt. Dies legt die Vermutung nahe, dass die genotypischen Veränderungen im Rahmen der HSP nicht der einzige modulierende Faktor für die Ausprägung des klinischen Bildes sind und bisher nicht-identifizierte Einflüsse (wie z.B. Umweltfaktoren oder epigenetische Störungen) eine Rolle spielen (Fink 2013, Tesson et al. 2015).

Eine weitere Begünstigung der genetischen Heterogenität der HSP liegt in der Vielfalt an möglichen Mutationen begründet. Neben Deletion und Insertion treten auch Missense-, Nonsense-, Spleiß- und Frameshift-Mutationen oder somatische Mosaik auf (Tesson et al. 2015, Orsucci et al. 2014, Aulitzky et al. 2014). Entsprechend der zugrunde liegenden Mutation kommt es zur Variation des klinischen Bildes. Eine Frameshift- oder Missense-Mutation in SPG 31, welches REEP1 (receptor expression-enhancing protein 1) kodiert, führt über Veränderungen der Aktivität G-Protein-gekoppelter Rezeptoren sowie der Proteinbindungsfähigkeit für ATL1 (Atlastin-GTPase 1) zu einer HSP-Erkrankung. Durch eine In-frame-Mutation, welche keinen Einfluss auf die ATL1-Bindungskapazität hat, entsteht das klinische Bild der Hereditären Motorischen Neuropathie Typ V (Tesson et al. 2015). Auch bei anderen Erkrankungen, wie der Charcot-Marie-Tooth-Neuropathie, der ALS oder der systemischen Muskelatrophie, können Veränderungen in SPG-Genen nachgewiesen werden (Daoud et al. 2012, Stevanin et al. 2008). Dieses Overlapping verschiedener Erkrankungen (Abb. 2) wurde als Ursache für komplexe Zusatzsymptome im Rahmen einer HSP, wie die Affektion peripherer Nerven oder des unteren Motoneurons, detektiert (Tesson et al. 2015). In Anbetracht dessen muss im Rahmen der Diagnosestellung die Zusammenschau des genetischen Befundes und der prominenteren klinischen Symptome erfolgen.

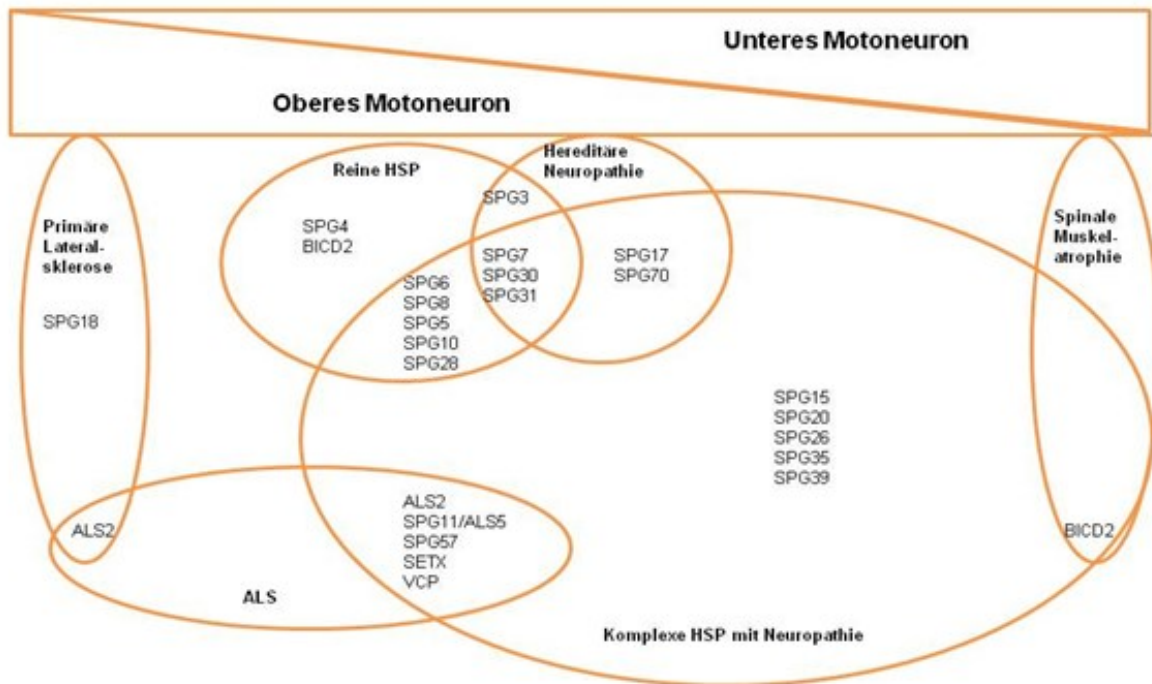


Abb. 2: Klinische und genetische Assoziationen mit HSP entsprechend des motoneuronalen Phänotyps (modifiziert nach Tesson et al. 2015)

1.1.2 Pathophysiologie der Hereditären Spastischen Spinalparalyse

Die Mehrheit der durch die SPG- und HSP-assoziierten Gene kodierten Proteine sind an der Morphogenese des endoplasmatischen Retikulums, der Dynamik und dem Transport entlang der Mikrotubuli, mitochondrialen Prozessen, am Lipidstoffwechsel sowie an endo- und lysosomalen Funktionen beteiligt (Blackstone 2012). Durch Veränderungen in Spastin (SPG4) und Kinesin-heavy-chain-isoform-5A (SPG10) entstehen Störungen im axonalen Transport sowie der axonalen Zytoskelettstruktur. Defizite im Aufbau und Funktion des endoplasmatischen Retikulums bis hin zu Störungen in den stressinduzierten proapoptotischen Prozessen und Hemmung der Proteinsynthese basieren auf Pathologien in Atlastin (SPG3A), REEP1 (SPG31) oder Strumpellin (SPG8). Resultierend aus Mutationen in SPG7 (Paraplegin) oder SPG13 (Chaperonin60/heat-shock-protein 60), deren kodierte Proteine proteolytische und chaperon-ähnliche Wirkungen besitzen, kommt es zur Affektion der Atmungskette und der Strukturkontrolle neusynthetisierter Proteine. Mutationen im SPG3A-Gen (Atlastin) und SPG21-Gen (Maspardin) führen zur Funktionseinschränkungen des Golgi-Apparates. Zudem kann es im Rahmen der HSP auch zu Veränderungen in Myelinproteinen, wie dem Proteolipoprotein (SPG2), und damit zu Störungen in der

Reifung und Kompaktierung des Myelins kommen. Auch die embryonale Entwicklung der Pyramidenbahn kann durch Mutationen in SPG-Genen (zum Beispiel SPG1, kodierend für L1-CAM) mit Effekt auf die neuronale Zellmigration betroffen sein. Zudem konnten zum Beispiel bei Mutationen im SPG28-Gen (DDHD1) Effekte auf den Fettsäure- und Phospholipidmetabolismus als mögliche weitere Genese für die Entwicklung einer HSP detektiert werden (Fink 2013, Botzolakis et al. 2010, Tesson et al. 2015). Aktuell berichtet wird über eine Mutation im ATP13A2/PARK9-Gen bei komplexer HSP (SPG78), welche über den Verlust der Autophosphorylierungsaktivität der lysosomalen ATPase ATP13A2 zu einem verminderten zellulären Schutz, unter anderem vor Schwermetallionen, und damit zur Neurodegeneration führt (Estrada-Cuzcano et al. 2018).

Daten über histopathologische Befunde des peripheren Nervs im Rahmen einer HSP liegen bislang nicht vor. Deshalb eröffnen elektrophysiologische Messmethoden die Möglichkeit, Einblicke in die axonale Erregbarkeit des peripheren Nervs zu gewinnen und somit Veränderungen der Funktion und Ionenkanalleitfähigkeit bei HSP zu detektieren.

1.2 Physiologie des peripheren Nervs

Neuronale Axone sind im peripheren Nervensystem von Schwann-Zellen umgeben, welche eine lamellenartige, isolierende Struktur bilden. Im Längsschnitt betrachtet unterteilt sich die Markscheide in isolierte, mit Myelin ummantelte, circa 1,5 mm lange Internodien sowie nodale, unmyelinisierte Abschnitte; die Ranvier-Schnürringe. Eine Erregung der Axonmembran durch elektrische Impulse ist aufgrund der fehlenden Isolierung nur nodal möglich. Die hieraus resultierende Erregungsweiterleitung erfolgt saltatorisch, von Schnürring zu Schnürring und gestaltet sich umso effektiver je ausgebildeter die Myelinschicht und je größer die Internodien sind. Eine Vielzahl dieser Nervenzellfortsätze bildet den myelinisierten, peripheren Nerv (Trepel 2008).

1.2.1 Elektrophysiologische Grundlagen

Die Grundlage für die Erregungsentstehung und -weiterleitung an einer Nervenfaser sind elektrische Prozesse, welche sich an der Zellmembran abspielen. Basierend auf

der elektrischen Potentialdifferenz zwischen Intra- und Extrazellularraum entsteht das Ruhemembranpotential. Dieses beruht vor allem auf dem Diffusionspotential von K^+ sowie der selektiven Permeabilität von Ionenkanälen und wird unter ATP-Verbrauch durch die $3Na^+-2K^+$ -ATPase (Na^+-K^+ -Pumpe) aufrechterhalten. Das Ruhemembranpotential in Nerven- und Muskelzellen beträgt zwischen -90 und -70 mV. Ausgehend von diesem Ruhemembranpotential kann es durch äußere Einflüsse zu schnellen Potentialänderungen der Zellen kommen. Bis zum Erreichen des Schwellenwertes erfolgen diese Potentialveränderungen lokal, ohne Weiterleitung entlang der Nervenfasern. Wird durch einen depolarisierenden Impuls die Schwelle von circa -50 mV überschritten, kommt es zur Entstehung des Aktionspotentials (AP) (Abb. 3) und Ausbreitung der Potentialänderung über die gesamte Membran. Das AP stellt sich unabhängig von der Stärke des auslösenden Reizes nach dem Alles-oder-Nichts-Gesetz immer gleichförmig dar. Durch die Summierung der in einer kurzen Zeitspanne von einer einzelnen Synapse (zeitliche Summation) oder mehrerer Synapsen (räumliche Summation) ausgehenden erregenden und hemmenden Potentiale (zeitliche Summation) entsteht das AP am Axonhügel. Aufgrund einer Depolarisation über das Schwellenpotential hinaus kommt es durch die Aktivierung von Na^+ -Kanälen zur Zunahme der Membranpermeabilität mit starkem Einstrom von Na^+ entlang des Konzentrationsgefälles und konsekutiver Positivierung des Membranpotentials.

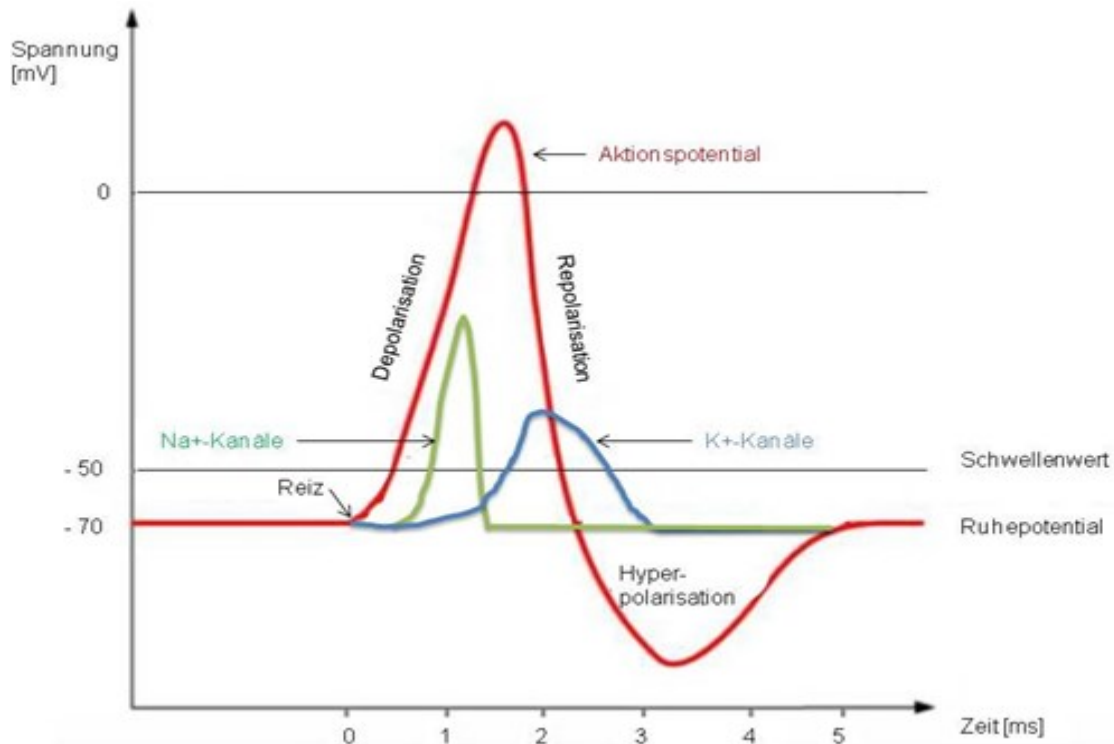


Abb. 3: Aktionspotential (rot) und Öffnungswahrscheinlichkeit der Membrankanäle für Na⁺ (grün) und K⁺ (blau) (modifiziert nach Schmidt und Schaible 2006)

Zusätzlich kommt es in der Depolarisationsphase bereits zur spannungsabhängigen, jedoch deutlich langsameren, Öffnung der K⁺-Kanäle mit nachfolgender Erhöhung der K⁺-Membranpermeabilität. Nach Inaktivierung der Na⁺-Kanäle entsteht durch den Ausstrom von K⁺ entlang des Konzentrationsgefälles und daraus resultierender Negativierung des Membranpotentials die Repolarisationsphase. Da K⁺-Kanäle im Vergleich zu Na⁺-Kanälen deutlich langsamer inaktivieren, kann es durch den weiteren K⁺-Ausstrom zu einer Negativierung über das RMP hinaus kommen (Hyperpolarisation).

In humanen Neuronen beträgt die Dauer eines AP von Beginn der Depolarisationsphase über die Repolarisation bis zum Wiedererreichen des RMP circa 1 ms. Kommt es kurz nach Beginn eines AP zu einer erneuten Depolarisation, kann für circa 1 - 2 ms der Schwellenwert der Zelle beliebig überschritten werden ohne dass es zur Auslösung eines weiteren AP kommt; das Neuron befindet sich in der absoluten Refraktärzeit, die spannungsabhängigen Na⁺-Kanäle sind in einem inaktivierten, geschlossenen Zustand. In der nachfolgenden relativen Refraktärzeit befinden sich die Na⁺-Kanäle im noch geschlossenen, aber aktivierbaren Zustand, sodass eine erneute Erregung der Zelle durch einen überschwelligen Reiz möglich

ist. Der Anstieg der Depolarisation verbleibt jedoch ebenso wie Amplitude des Aktionspotentials während dieser Refraktärzeit reduziert (Burke et al. 2001, Schmidt und Schaible 2006).

1.2.2 Verteilung der Ionenkanäle

Für die, dem Aktionspotential zugrunde liegende, Änderung des RMP sind Transmembranproteine mit der Fähigkeit des Ionentransportes essentiell. Neben den Ionenpumpen, welche Ionen entgegen des Konzentrationsgefälles unter ATP-Verbrauch transportieren, spielen die Ionenkanäle eine zentrale Rolle. Durch diese gelangen Ionen passiv, durch Diffusion, über die Zellmembran. Sie stellen durchgängige Membranporen dar, die sich durch biochemische Eigenschaften wie hohe Flussraten, große Selektivität sowie unterschiedliche Funktionszustände (offen, geschlossen, aktiv, inaktiv) auszeichnen (Müller-Esterl 2004). In einem von Barrett und Barrett (Barrett und Barrett 1982) postulierten, und später von Bostock (Bostock et al. 1998) modifizierten Modell kommt die Verteilung und Bedeutung der Ionenkanäle des humanen myelinisierten Nervs, beruhend auf einem elektrischen Äquivalenzschaltkreis der nodalen und internodalen axonalen Membran, zum Ausdruck (Abb. 4) (Grosskreutz 1999). Demnach sind die nodal gelegenen, transienten Na^+ -Kanäle von zentraler Bedeutung für die Evozierung des Aktionspotentials, während die Repolarisation insbesondere auf den nodal und paranodal lokalisierten langsamen Kaliumkanälen basiert (Barrett und Barrett 1982). Allgemein besteht eine Ungleichverteilung der Ionenkanäle entlang des Axons. Da 99,9% der axonalen Membran aus Internodium bestehen, ist in diesem Bereich auch eine höhere Anzahl an Ionenkanäle vorzufinden als nodal (Burke et al. 2001). Aufgrund der jedoch deutlich erhöhten Kanaldichte der nodalen Membran mit beispielsweise $1000 \mu\text{m}^{-2}$ Na^+ -Kanälen im Vergleich zu $25 \mu\text{m}^{-2}$ Na^+ -Kanälen internodal ist eine AP-Auslösung ausschließlich am Ranvier-Schnürring möglich. Nodal ist eine hohe Dichte an Na^+ -Kanälen, welche sich zu 98% aus spannungsabhängigen, transienten (Na_t) und 2% persistenten (Na_p) Kanälen zusammensetzen, und langsamen K^+ -Kanälen (K_s) beschrieben.

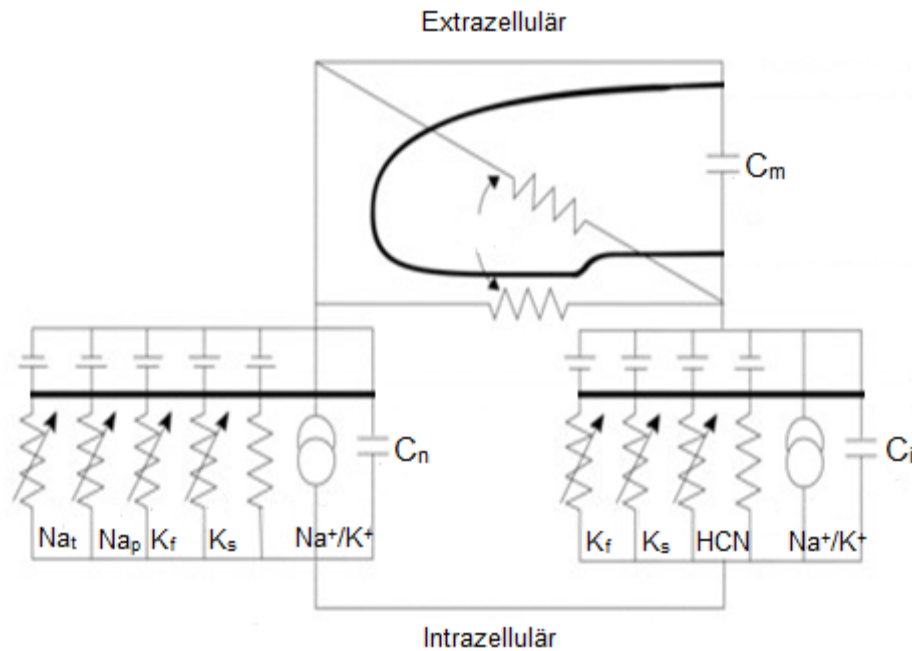


Abb. 4: Modifiziertes Barrett-und-Barrett-Modell. C_m : Kapazität der Myelinscheide, C_n : Kapazität der nodalen Region, C_i : Kapazität der internodalen Region. Na_t : transiente Natrium-Kanäle. Na_p : persistente Natrium-Kanäle. K_f : schnell inaktivierende Kalium-Kanäle. K_s : langsam inaktivierende Kalium-Kanäle. $HCN = I_h$: hyperpolarisationsaktivierte Kationen-Kanäle. Na^+/K^+ : Natrium-Kalium-ATPase (modifiziert nach Bostock et al. 1998 und Howells et al. 2012)

Erstere dienen zur Entstehung des AP, während die K_s^+ -Kanäle eine wichtige Rolle für die Wiederherstellung des RMP spielen. Schnelle K^+ -Kanäle (K_f) sind hauptsächlich paranodal, zur Widerstandserhöhung der internodalen Membran und Limitierung eines depolarisierenden Nachpotentials, vertreten, wobei auch eine geringe Dichte an der nodalen Region auftritt. Internodal sind Ionenkanäle bekannt, welche durch Hyperpolarisation langsam aktiviert werden und sowohl Na^+ - als K^+ -Ionen leiten. Diese Hyperpolarisations-aktivierten Kationenkanäle (I_h bzw. HCN) dienen zur Begrenzung der Hyperpolarisation (Burke et al. 2001, Krishnan et al. 2009).

1.2.3 Na^+ -Kanäle

Na^+ -Kanäle werden in nicht-spannungsabhängige und spannungsabhängige Formen unterschieden, wobei für die biophysikalischen Prozesse des menschlichen Nervensystems ausschließlich die spannungsaktivierten Formen (Na_v) eine wesentliche Rolle spielen. Die transmembranösen Na^+ -Kanäle bestehen aus

einer circa 260 kDA großen α -Untereinheit, welche sich aus 4 homologen Domänen (I-IV) zusammensetzt und die Pore des Na^+ -Kanals bildet. Jede dieser homologen Domänen besteht aus circa 300 Aminosäuren und enthält je 6 Transmembransegmente (S1-S6). Zusätzlich können α -Untereinheiten mit 1 bis 2 regulierenden β -Untereinheiten assoziiert sein, welche nur ein Transmembransegment besitzen (Abb. 5) (Krishnan et al. 2009). Die Transmembransegmente (α -Helices) der α -Untereinheit stellen spezialisierte Regionen zur Gewährleistung der Na^+ -Kanal-Funktion dar. S4 ist ein wichtiger Bestandteil für die Vermittlung der spannungsabhängigen Konformitätsänderungen, welche mit der Kanalaktivierung und -inaktivierung einhergehen. Durch die Detektierung von RMP-Veränderungen dient dieses Transmembransegment als Spannungssensor des Na^+ -Kanals (Müller-Esterl 2004, Krishnan et al. 2009). Zwischen S5 und S6, auf der extrazellulären Seite der Kanalpore gelegen, befindet sich die P-Schleife, die durch negativ geladene Aminosäuresequenzen als Selektivitätsfilter dient und das Passieren von Anionen verhindert. Durch eine kleine Porengröße von maximal 0,5 nm Durchmesser entsteht zudem eine Selektivität für Na^+ -Ionen, größere Kationen wie zum Beispiel K^+ können nicht passieren (Müller-Esterl 2004, Krishnan et al. 2009). Die β -Untereinheit ist gemeinsam mit einem intrazellulären „Loop“ zwischen S3 und S4 der α -Untereinheit am „Gating“, der Konformationsänderung des Kanals, beteiligt. Der Na_v besitzt 2 Ionenpermeable Tore, das M-Tor der extrazellulären Membranseite, sowie das H-Tor der zytosolischen Seite. Während eines stabilen RMP befindet sich der Na^+ -Kanal im geschlossenen, aktivierbaren Zustand; das M-Tor ist geschlossen, das H-Tor geöffnet. Ein Einstrom von Na^+ -Ionen über die Membran in das Axon ist nicht möglich. Durch eine S4-detektierte Membrandepolarisation wird der Na^+ -Kanal aktiviert, das M-Tor öffnet sich und Na^+ -Ionen strömen ein. Nach circa 1 ms geht der Na^+ -Kanal unabhängig von der Membranspannung durch den Schluss des H-Tors (Inaktivierungsdomäne) in den geschlossenen, inaktivierbaren Zustand über (Müller-Esterl 2004). Erst durch die Hyperpolarisation kehrt der Na^+ -Kanal in die geschlossene, aktivierbare Form zurück (Catterall et al. 2005).

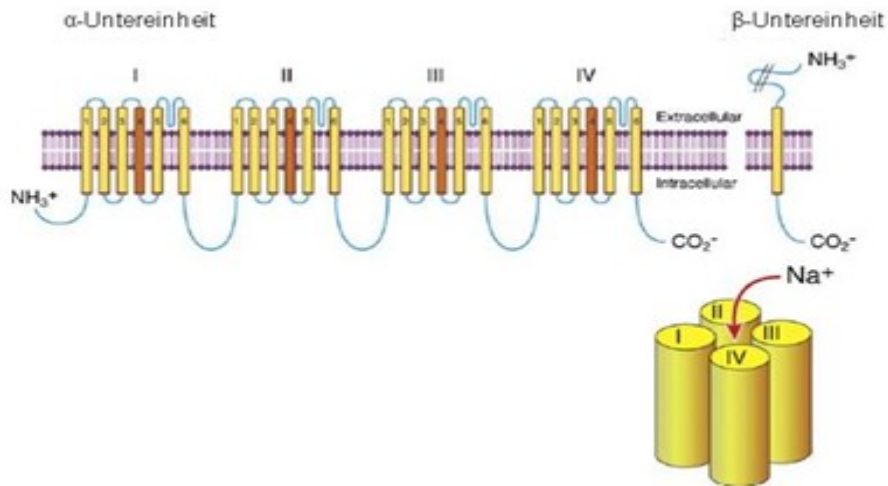


Abb. 5: Struktur eines spannungsabhängigen Na^+ -Kanals (modifiziert nach Krishnan et al. 2009)

Die Na_v werden funktionell in Na_t und Na_p unterteilt. Na_t besitzen eine schnelle Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik; Na_p stellt einen langsam inaktivierenden Kanal dar, dessen Schwellenwert 10 bis 15 mV negativer als Na_t ist (Baker und Bostock 1997, Kiernan et al. 2003). Aktuell sind 9 verschiedene Isoformen der α -Untereinheit spannungsabhängiger Na^+ -Kanäle im humanen Nervensystem bekannt. Neben der Größe und der regionalen Expression variieren diese verschiedenen Typen auch in ihren elektrophysiologischen Eigenschaften (Goldin et al. 2000, Goldin et al. 2001, Catterall et al. 2005). Für jede dieser Isoformen ($\text{Na}_v1.1$ – $\text{Na}_v1.9$) ist ein spezifisches Gen (SCN1A – SCN5A , SCN8A – SCN11A) bekannt. $\text{Na}_v1.7$ bis $\text{Na}_v1.9$ sind überwiegend im peripheren Nervensystem vertreten, $\text{Na}_v1.1$ und $\text{Na}_v1.6$ sind auch im zentralen Nervensystem exprimiert (Krishnan et al. 2009). Die Isoform $\text{Na}_v1.6$ ist in hoher Dichte am Ranvier Schnürring vertreten und bildet dort den vorherrschenden Kanaltyp (Caldwell et al. 2000).

1.2.4 K^+ -Kanäle

Die K^+ -Kanäle stellen die größte und vielgestaltigste der Ionenkanalfamilien dar. Neben den spannungsabhängigen K^+ -Kanälen sind unter anderem auch Einwärtsgleichrichter (I_h) und Kanäle mit einer Sensitivität für Ca^{2+} , Na^+ und ATP bekannt. Allen diesen Unterformen ist der Aufbau als Tetramer mit identischen oder verschiedenen α -Untereinheiten gemein (Krishnan et al. 2009). Im peripheren

Nervensystem spielen die spannungsabhängigen K^+ -Kanäle (K_v) durch die Aufrechterhaltung des RMP eine entscheidende Rolle für axonale Erregbarkeit des Nerven. K_v sind Homotetramere mit je 6 Transmembrandomänen (S1-S6) pro α -Untereinheit. S4 dient, ebenso wie bei den Na_v , als Spannungssensor. P-Schleifen zwischen S5 und S6 stellen den Selektivitätsfilter dar. Da im Gegensatz zu den Na_v die K_v durch Ionen mit Hydrathülle passiert werden, ist der K_v selektiv für K^+ -Ionen, die eine wesentlich geringere Ladungsdichte aufweisen als Na^+ -Ionen. Anhand der Kinetik unterscheidet man die beiden wichtigsten Unterformen der K_v : K_f und K_s - Kanäle (Burke et al. 2001). Diese Kanäle oszillieren kontrolliert durch Änderungen des RMP zwischen einem offenen und geschlossenen Zustand (Müller-Esterl 2004). K_f wird insbesondere durch KCNA1 exprimiert und besitzt seine höchste Dichte im Paranodalraum. Die Aktivierung erfolgt durch Potentiale zwischen -50 und +50 mV. Beim Auftreten von Potentialen zwischen -120 und -65 mV kommt es zur sofortigen Deaktivierung der Kanäle (Reid et al. 1999, Krishnan et al. 2009). K_s haben ihre höchste Dichte in der nodalen Region und werden durch Potentiale um -110 mV aktiviert. Im Vergleich zu den K_f besitzen sie eine langsamere Deaktivierungskinetik und spielen nur eine geringe Rolle in der Repolarisation der axonalen Membran (Krishnan et al. 2009). Eine weitere, im peripheren Nervensystem vorkommende, Unterform der K^+ -Kanäle stellen die Einwärtsgleichrichter (I_h) dar. Im Gegensatz zu den K_v besitzen diese nur 2 Transmembrandomänen. I_h -Ströme werden durch Potentiale um -45 bis -60 mV aktiviert (Pape 1996, Krishnan et al. 2009). Sie dienen durch die Möglichkeit des K^+ -Transportes nach intrazellulär der Stabilisierung des RMP und wirken einer zu starken Hyperpolarisation entgegen.

1.3 Threshold Tracking

Das Threshold Tracking (TT) stellt eine elektrophysiologische Methode dar, welche es ermöglicht, die axonale Membranfunktion nichtinvasiv in vivo zu testen. In der klassischen klinischen Elektrophysiologie wird auf den zu untersuchenden Nerv ein Stimulus mit adaptierbarer Amplitude und konstanter Dauer appliziert. Grundvoraussetzung, um durch diese Untersuchungen Rückschlüsse auf den Zustand des Nerven ziehen zu können, ist ein supramaximaler Stimulus. Im Gegensatz zur klinischen Elektrophysiologie ist das TT unsensibel gegenüber der Anzahl erregter Nervenfasern und unabhängig von der Nervenleitgeschwindigkeit

(Krishnan et al. 2009). Vielmehr gewährt diese Methode durch kontinuierliche Schwellenwertbestimmung und Applikation de- und hyperpolarisierender Stimuli Einblicke in die Aktivität von Ionenkanälen, -pumpen und -austauschprozessen (Huynh und Kiernan 2015).

Bereits 1970 wurden durch J. Bergmans die Grundlagen für das TT geschaffen. Er entwickelte eine alternative elektrophysiologische Messmethode, deren Grundidee auf der Variation der Reizstärke zum Erreichen einer festen Zielantwort beruhte. Durch Raymond wurde 1979 der Threshold Tracker - als erstes Gerät, welches den technischen Anforderungen von Bergmans Überlegungen gerecht werden konnte - entwickelt (Raymond 1979). Diese Methode wurde im Verlauf der letzten Jahrzehnte insbesondere durch H. Bostock vorangebracht. Nach erfolgreichen in-vitro-Tests wurde durch ihn auch Qtrac®, als Programm für die in-vivo-Messung der axonalen Erregbarkeit peripherer Nerven, entwickelt (Bostock et al. 1998).

Jede Nervenfaser besitzt einen individuellen Schwellenwert zur Auslösung eines AP. Basierend hierauf wird im Rahmen des TT mit einer geringen Stromstärke gereizt, um die Erregung eines vordefinierten Prozentsatzes an Nervenfasern zu triggern. Den Indikator für die Anzahl erregter Fasern stellt das Summenmuskelaktionspotential (CMAP) des Erfolgsorganes dar. Stimuli von 1 ms Länge werden in regelmäßigen Intervallen mit einer Pause von 1 ms auf den Nerv appliziert und schrittweise bis zum Erreichen der festgelegten Zielantwort erhöht. Üblicherweise wird diese Zielantwort als 40% des möglichen maximalen CMAP festgelegt. Nach Erreichen dieser, erfolgt eine protokollabhängige Applikation verschiedener Testimpulse. Durch den Vergleich der Unterschiede im Schwellenstrom ist es möglich, Rückschlüsse auf Membranpotential und Erregbarkeit des gemessenen Nerven zu ziehen. Diese sind Ausdruck der zugrunde liegenden Ionenprozesse (Burke et al. 2001, Krishnan et al. 2009, Bostock et al. 1998).

Das TT bietet den Vorteil, diese Schwellenwertveränderungen zwischen verschiedenen Subjekten, aber auch zwischen verschiedenen Spezies, zu vergleichen. Zudem besteht die Möglichkeit, sowohl an motorischen als auch sensiblen Axonen die Membraneigenschaften zu testen (Bostock et al. 1998). Hierbei haben sich in vorangegangenen Studien biophysikalische und funktionelle Unterschiede zwischen den Faserqualitäten gezeigt. Durch einen erhöhten Anteil an Na_p und gesteigerten internodalen Widerständen in sensiblen Nerven, welche sich in

einer längeren Strength-duration time constant und reduzierten Rheobase zeigen, besteht eine erhöhte Neigung zu Ischämien und anderen Schädigungen. In motorischen Fasern ist eine vergleichsweise erhöhte Refraktärzeit durch die längere Dauer des AP nachweisbar (Kiernan et al. 2001, Krishnan et al. 2009). Auch Veränderungen des Nerven unter Ischämie wurden untersucht. Hierbei zeigte sich eine, durch ATP-Mangel der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ bedingte, Veränderung des K^+ -Gleichgewichtspotentials mit Zunahme des extrazellulären K^+ sowie des intrazellulären Na^+ mit daraus resultierender Depolarisation des Axons und erniedrigter Permeabilität der Na^+ -Kanäle (Grosskreutz et al. 1999, Grosskreutz et al. 2000, Krishnan et al. 2005). Zudem konnte eine Zunahme der axonalen Erregbarkeit unter Hyperventilation durch Veränderungen des extrazellulären pH-Wertes beobachtet werden. Unter diesen Bedingungen entsteht ein Block des späten Na^+ -Stroms durch die Reduktion aktiver Kanäle und die Verminderung der Na^+ -Kanalleitfähigkeit (Mogyoros et al. 1997, Baker und Bostock 1999). Auch Veränderungen im Rahmen einer diabetischen Polyneuropathie konnten durch das TT aufgezeigt werden. Durch eine eingeschränkte $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Pumpenfunktion}$ kommt es zu einer intraaxonalen Na^+ -Ansammlung mit Reduktion des Na^+ -Stroms. Zudem reduziert eine diabetogene Stoffwechsellage mit Hyperglykämien die nodale K^+ -Leitfähigkeit durch Suppression der K^+ -Kanäle beziehungsweise durch Reduktion des K^+ -Membranquotienten (Misawa et al. 2005a, Misawa et al. 2005b). Des Weiteren erfolgten ausführliche Studien über Veränderungen der axonalen Erregbarkeit im Rahmen von Motoneuronenerkrankungen, auf welche später genauer eingegangen wird. Es bestehen Unterschiede in der axonalen Erregbarkeit verschiedener Nerven eines Individuums. Zwischen dem N. medianus und dem N. ulnaris bestehen unter anderem Unterschiede in der Strength-duration time und der Reaktion auf hyperpolarisierende Stimuli im Threshold electrotonus (Murray und Jankelowitz 2011).

1.3.1 Strength-duration relationship

Dieser Messabschnitt des TT beschreibt den Zusammenhang zwischen Stimulusintensität und Reizdauer. Er spiegelt den nodalen Na_p -Strom unter Ruhebedingungen wider (Burke et al. 2001). Dem Weiss-Gesetz entsprechend, führt eine Zunahme der Stimulusdauer zu einer Reduktion der notwendigen

Stimulusintensität um eine identische Antwort zu erreichen (Weiss 1901). Zur Exploration des notwendigen Schwellenwertes für die Auslösung einer Zielantwort erfolgt die Reizung des Nervs mit zwei verschiedenen Stimulusdauern (0,2 ms und 1 ms) sowie mit steigender Stromstärke. Hieraus resultiert die Stimulus-response-curve (Abb. 6).

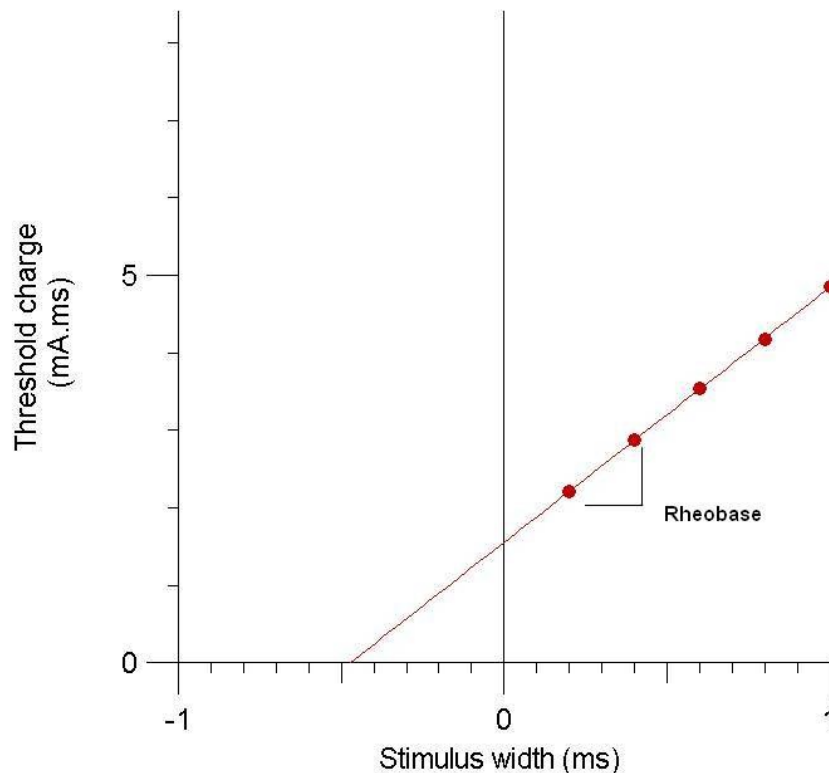


Abb. 6: Stimulus-response-curve entsprechend des Weiss-Gesetz

Der Anstieg der Kurve ist Ausdruck der geringsten Stromstärke, welche am Axon ein AP auslösen kann: die Rheobase. Zudem erfolgt automatisiert die Kalkulation der Strength-duration time constant (TSD), als Ausdruck der Chronaxie des Axons. Hierbei handelt es sich um die kleinste Reizdauer, bei welcher ein Stimulus mit doppelter Rheobasenstärke zur Erregung des Nervs führt (Mogyoros et al. 1996, Krishnan et al. 2009). Eine Zunahme der TSD und eine Reduktion der Rheobase sind Ausdruck einer gesteigerten Na_p -Leitfähigkeit (Burke et al. 2001).

1.3.2 Threshold electrotonus

Der Threshold electrotonus (TE) stellt die einzige verfügbare in-vivo-Untersuchung zur Messung der internodalen Leitfähigkeit, durch Visualisierung der zugrunde liegenden Membranpotentialschwankungen, dar (Bostock et al. 1998, Burke et al. 2001). Hierfür erfolgt die Applikation unterschwelliger, langandauernder (100 ms) Reize zur Testung der axonalen Schwellenwerte. Diese Stimuli sind zwar nicht ausreichend um ein AP auszulösen, führen aber dennoch zu signifikanten Auswirkungen auf die axonale Erregbarkeit sowie das RMP und damit zu Veränderungen der Aktivität internodaler Ionenkanäle. Nach verschiedenen Zeitintervallen, im 10 ms Takt, erfolgt die Gabe von depolarisierenden und hyperpolarisierenden Reizen zur Objektivierung des Einflusses auf den Schwellenwert und das CMAP. In der automatisch erstellten TE-Kurve werden auf der x-Achse die Verzögerung zwischen unterschwelligem, langandauerndem Reiz der Teststimuli dargestellt, auf der y-Achse die prozentuale Schwellenwertreduktion. Aufgezeigt werden hier die Reaktionen des Axons auf 20- und 40%ige depolarisierende und hyperpolarisierende Impulse (Abb. 7).

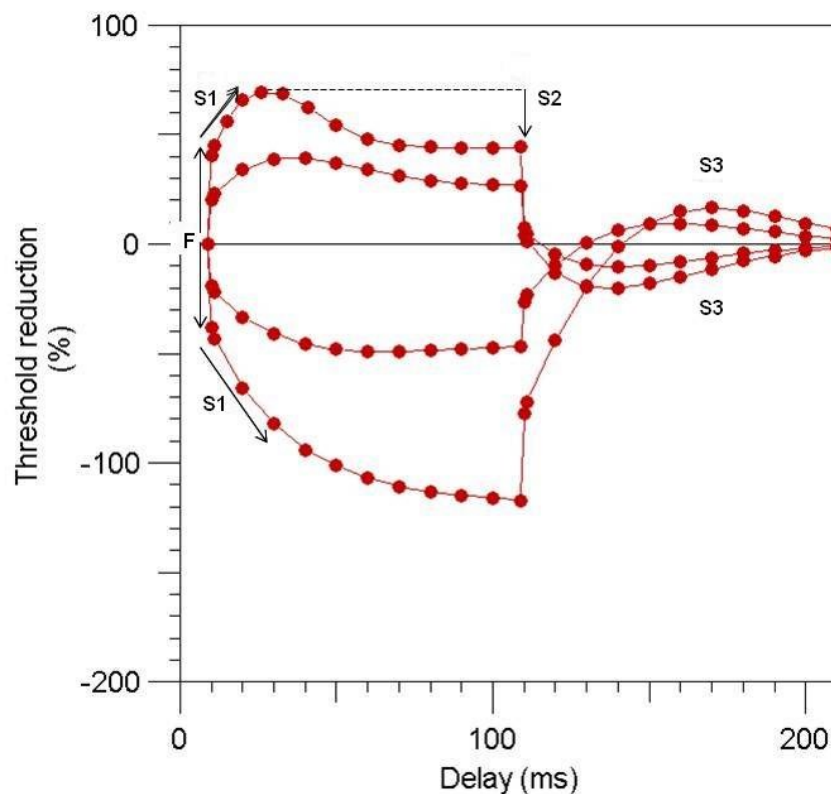


Abb. 7: Threshold electrotonus, Reaktion auf depolarisierende Impulse werden oberhalb, Reaktionen auf hyperpolarisierende Impulse unterhalb der Nulllinie dargestellt

Zu Beginn der Kurve imponiert eine schnelle Phase als Antwort auf den initialen unterschwelligen, de- und hyperpolarisierenden Impuls. Der Anstieg dieser F-Phase ist proportional zum applizierten Strom und reflektiert damit die nodale De- und Hyperpolarisation (Burke et al. 2001). Ihr folgt die S1-Phase, welche die langsame Ausbreitung der De- und Hyperpolarisation im Internodalraum objektiviert. Die hyperpolarisierende S1-Phase stellte sich aufgrund der hyperpolarisationsbedingten Deaktivierung paranodaler K_f und konsekutiver Erhöhung des internodalen Membranwiderstandes ausgeprägter und länger dar. Das Maximum wird 100 ms nach Beginn des hyperpolarisierenden Reizes erreicht. Im Gegensatz dazu verläuft die depolarisierende S1-Phase durch die depolarisationsbedingte Aktivierung der paranodalen K_f verkürzt. Das Maximum wird hier 20 ms nach Beginn des depolarisierenden Reizes erreicht (Burke et al. 2001, Krishnan et al. 2009). Essentiell für diese Vorgänge sind insbesondere die K_f -Kanäle. Im depolarisierenden Bereich folgt anschließend die S2-Phase, welche die mit der Aktivierung der K_s -Kanäle

assoziierte Anpassung an die Depolarisation visualisiert (Kuwabara und Misawa 2014). Gegen Ende des depolarisierenden Impulses kommt es durch beginnende Hyperpolarisation zu einem Ansteigen des Schwellenwertes und einer Reduktion des nodalen Widerstandes. Eine S2-Phase im hyperpolarisierenden Bereich besteht, aufgrund der Inaktivität der K_s -Kanäle, während der Hyperpolarisation nicht (Burke et al. 2001). Der letzte Abschnitt des TE, die S3-Phase, besteht aus der passiven Repolarisation der internodalen Membran durch Aktivierung axonaler I_h -Kanäle (Bostock et al. 2001, Krishnan et al. 2009). Von einem fanning in spricht man, wenn es zu einer Abflachung der Kurven in Richtung Baseline als Ausdruck einer geringeren Schwellenreduktion kommt. Diese beruht auf einer gesteigerten K^+ -Kanal-Aktivität, einer verringerten nodalen Na^+ -Leitfähigkeit und einer Reduktion des internodalen Membranwiderstandes. Das fanning out dagegen stellt eine Entwicklung der Kurven weg von der Baseline dar und basiert auf einer reduzierten K^+ -Kanal-Aktivität (Kiernan und Bostock 2000, Burke et al. 2001, Krishnan et al. 2009).

1.3.3 Current threshold relationship

Der Messabschnitt Current threshold relationship (IV) stellt die Strom-Spannungsbeziehung in einem Axon dar und reflektiert somit die Funktionsfähigkeit der Erregungsrückbildung in Abhängigkeit von der nodalen und internodalen Gleichrichterfunktion der Nervenfasern. Im IV werden Veränderungen des Schwellenwertes am Ende eines 220 ms andauernden, unterschwelligen, polarisierenden Stroms bei steigender Stromstärke dargestellt. Der polarisierende Puls wird in 10%-Schritten von einem +50% depolarisierenden auf einen -100% hyperpolarisierenden Impuls verändert (Krishnan et al. 2009). Grafisch stellt sich im oberen rechten Quadranten die Reaktion der Auswärtsgleichrichter auf einen depolarisierenden Reiz dar und spiegelt damit die Aktivierung von K_f und K_s wider (Abb. 8).

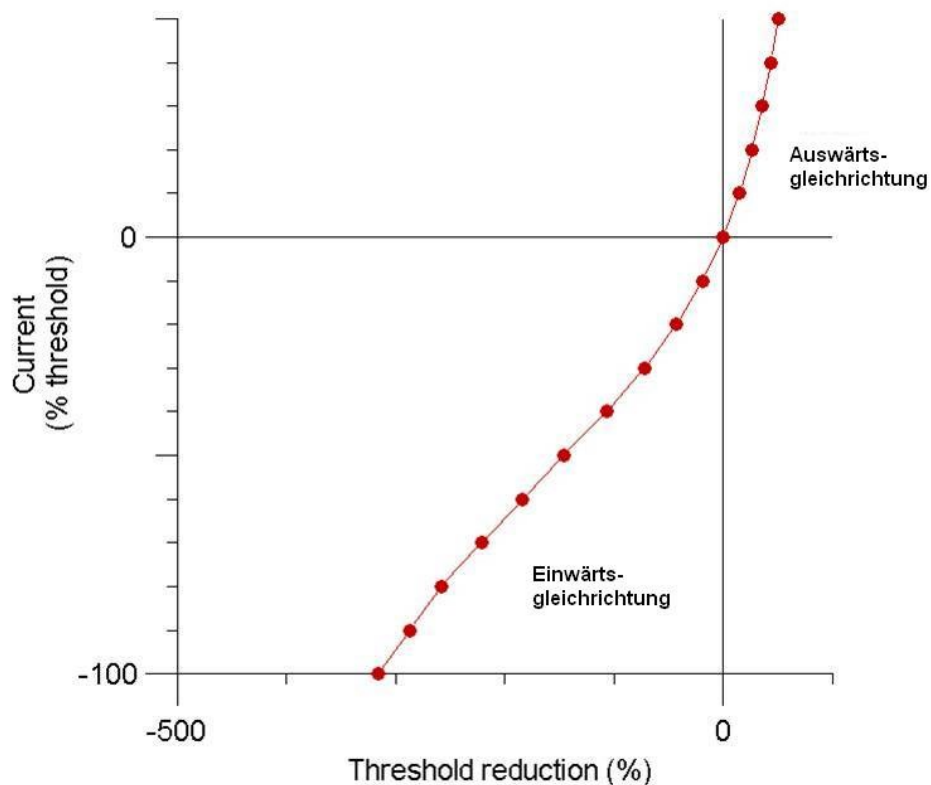


Abb. 8: IV zur Darstellung der Gleichrichter-Ionenleitfähigkeit als Reaktion auf depolarisierende und hyperpolarisierende Impulse

Im unteren linken Quadranten hingegen kommt die Reaktion der I_h als Antwort auf hyperpolarisierende Impulse, in Form der Aktivierung des I_h -Stroms, zur Darstellung (Kiernan et al. 2000).

1.3.4 Recovery Cycle

Der Recovery cycle (RC) dient zur Darstellung der Vorgänge an der Axonmembran nach einem kurzen, singulären, supramaximalen Impuls (Burke et al. 2001). In abnehmenden Zeitintervallen von 200 bis 2 ms erfolgt anschließend an diesen supramaximalen Impuls die Applikation von Teststimuli. Hieraus resultieren 4 Phasen der axonalen Erregbarkeit, welche durch das Programm Qtrac® in einer entsprechenden Grafik dargestellt werden (Abb. 9). Durch den initialen supramaximalen Impuls treten alle erregten Fasern, resultierend aus der Inaktivierung von Na^+ -Kanälen, für circa 0,5 bis 1 ms in die absolute Refraktärität ein:

Das Axon ist nicht erregbar. Entsprechend der langsamen Rückbildung der Na^+ -Kanal-Inaktivierung erfolgt im Verlauf der Übertritt in die circa 3 bis 4 ms andauernde relative Refraktärzeit. Diese ist durch höhere Schwellenwerte zur Auslösung eines AP charakterisiert (Burke et al. 2001). Als Ausdruck von, auf depolarisierenden Nachpotentialen beruhenden, Membranpotentialveränderungen tritt das Axon anschließend in die Phase der Superexcitability, der Übererregbarkeit ein.

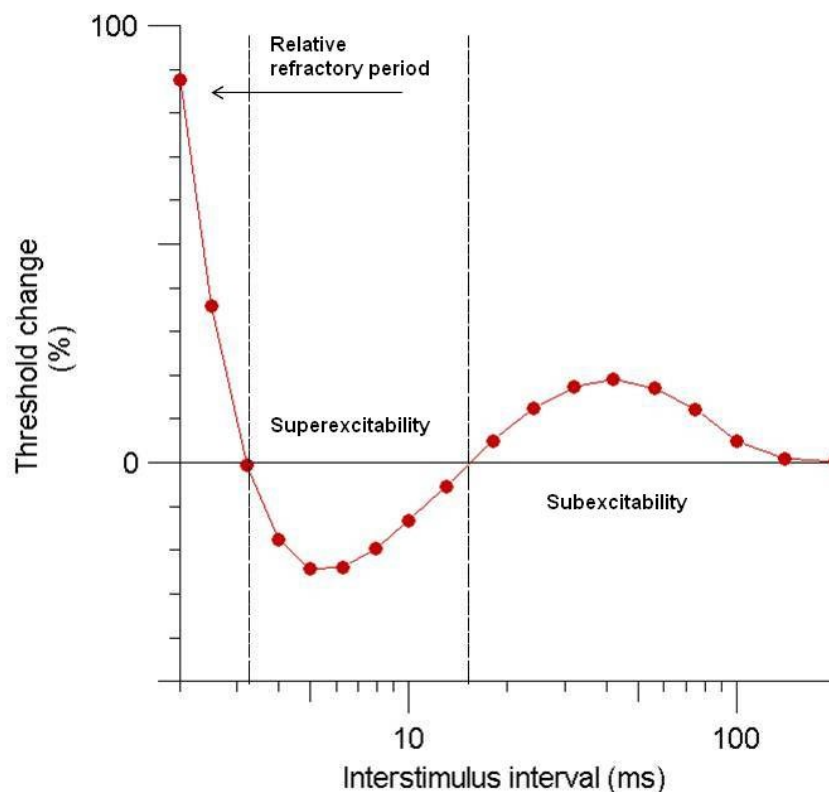


Abb. 9: Verlauf des RC nach einem supramaximalen Impuls mit konsekutiver absoluter Refraktärzeit

In dieser Phase ist die notwendige Reizstärke zur AP-Generierung deutlich geringer. In den motorischen Axonen des N. medianus endet die Superexcitability nach circa 7 ms durch die Depolarisation des internodalen Bereiches mit konsekutiver Aktivierung der paranodalen K_f -Kanäle und Reduktion des internodalen Membranwiderstandes (Burke et al. 2001, Krishnan et al. 2009). Die abschließende Phase der Subexcitability, der Untererregbarkeit, entsteht als Reaktion auf die Depolarisation der Membran. Sie ist durch die langsame Aktivierung und Deaktivierung der K_s -Kanäle charakterisiert, welche durch einen K^+ -Einstrom nach intrazellulär eine

Hyperpolarisation der Zelle begünstigen. Die Phase der späten Untererregbarkeit endet circa 100 bis 150 ms nach dem initialen supramaximalen Reiz mit der Rückkehr zum RMP.

2. Ziele der Arbeit

Die HSP präsentiert sich durch eine spastische Paraparese basierend auf der Degeneration des ersten Motoneurons. Es zeigen sich oft aber auch zusätzliche Symptome wie periphere Neuropathien.

Studien zur axonalen Erregbarkeit peripherer Nerven haben bereits in der Vergangenheit dazu beigetragen, subtile, subklinische Veränderungen der Neurone zu detektieren. Ein besseres Verständnis der axonalen Prozesse des peripheren Nervis bei Patienten mit HSP durch Erregbarkeitsstudien (wie dem TT) würde zusätzlich Rückschlüsse auf zugrunde liegende Ionenkanaldysfunktionen erlauben. Damit wären perspektivisch auch Diskussionen über therapeutische Ansätze, basierend auf den krankheitsspezifischen Veränderungen, möglich.

Ziel dieser Arbeit ist es, das Wissen über subklinische axonale Prozesse im Rahmen der HSP zu vertiefen und gegebenenfalls Parallelen zu Pathologien anderer Motoneuronerkrankungen ziehen zu können. Aufgrund der Annahme, dass Veränderungen der axonalen Erregbarkeit als Ausdruck einer Dysfunktion des peripheren Nervis in allen Extremitäten (nicht nur in den definitionsgemäß betont betroffenen unteren Extremitäten) erkennbar sind, erfolgte die motorische Untersuchung des N. medianus, als klinisch häufig nicht betroffener Nerv, im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe.

3. Methodik

3.1 Probanden

Alle Patienten nahmen freiwillig und unentgeltlich, entweder im Rahmen von Terminen in der neuromuskulären Ambulanz der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Jena, oder nach der Vorstellung der Studie auf dem Treffen der HSP-Selbsthilfegruppe, teil. Im Vorfeld wurden die Patienten mittels Probandeninformation über Ziele und Methoden der geplanten Messungen informiert und nach mündlicher Aufklärung und schriftlichem Einverständnis eingeschlossen. Die Studie erhielt ein positives Votum der Ethikkommission (Antrag 3042-02/11). Im Vorfeld der Untersuchungen gingen den Probanden standardisierte Fragebögen zur Einschätzung der Funktionseinschränkungen und zum Ausschluss relevanter Kontraindikationen zu. Probanden mit HSP wurden zudem bezüglich der Familienanamnese und erfolgter humangenetischer Beratung und Testung befragt. Alle personenbezogenen Daten wurden pseudonymisiert gespeichert und ausschließlich für statistische und wissenschaftliche Zwecke genutzt.

Untersucht wurden 26 Probanden mit einer gesicherten HSP und einem Durchschnittsalter von 57,23 Jahren (SD 11,12), sowie 21 gesunde Kontrollpersonen mit einem Altersdurchschnitt von 50,00 Jahren (SD 14,67). Ausschlusskriterien für die Teilnahme an der Studie waren neben vorbestehenden klinischen oder elektrophysiologischen Nervenkompressionssyndromen oder Polyneuropathien auch Rückenmarkskompressionssyndrome, ein Vitamin-B-Mangel, ein Drogen- oder Alkoholabusus, stattgehabte chemotherapeutische Behandlungen, ein manifestes dementielles Syndrom oder eine diabetogene Stoffwechsellage. Ferner wurden auch Träger von Defibrillatoren und Herzschrittmachern, sowie Probandinnen mit einer möglichen Schwangerschaft nicht in die Studie eingeschlossen.

In der Probandengruppe wurden 12 Frauen und 14 Männer, in der Kontrollgruppe 9 Frauen und 12 Männer eingeschlossen. Das mittlere Alter der Frauen in der HSP-Gruppe betrug zum Zeitpunkt der Messung 57,67 Jahre (SD 10,61), das der Männer 56,86 Jahre (SD 11,93). Das mittlere Alter der weiblichen Kontrollen betrug 47,0 Jahre (SD 13,87) und der männlichen Kontrollen 52,25 Jahre (SD 15,45).

3.2 Scores

Vor dem Experiment wurden alle Probanden gebeten, die ihnen zugesandten Fragebögen zu beantworten. Hierbei handelte es sich zum einen um den Spastic paraplegia rating scale (SPRS) zur Beurteilung des Funktionszustandes, zum anderen um einen Fragebogen zum Ausschluss relevanter Kontraindikationen.

3.2.1 Spastic paraplegia rating scale

Zur klinischen Beurteilung von Krankheitsschwere und -progression hat sich der SPRS als geeignet erwiesen (Klimpe et al. 2012, Schüle et al. 2006, siehe Anhang 8.2.2). Mit einer 13-Item-Skala ist eine Bewertung von krankheitsbedingten Funktionsbeeinträchtigungen in weniger als 15 Minuten ohne Notwendigkeit einer zusätzlichen speziellen Ausrüstung möglich.

Der SPRS wird mittels Beobachtung und Befragung mit Betroffenen und Angehörigen durchgeführt. Er umfasst innerhalb der 13 Fragen funktionelle Aspekte, Spastik, Schwäche und Kontrakturen der unteren Extremität, Schmerzen, sowie die Blasen- und Mastdarmfunktion. Zusätzlich ermöglicht der SPRS durch ein Inventar die Dokumentation zusätzlicher Symptome. Durch den engen Bezug der Fragen zum Alltag, sind sie für die Patienten schnell und präzise zu beantworten.

In Untersuchungen zum Nutzen dieser Skala imponiert eine hohe Korrelation mit dem Barthel-Index. Zudem ist eine umgekehrte Proportionalität zum SF-36 erkennbar, einem gut charakterisierten Instrument zur Erhebung der gesundheitsbezogenen Lebensqualität (Orsucci et al. 2014). Der SPRS zeichnet sich insgesamt als zuverlässiges und semiquantitatives Messinstrument zur Ermittlung von Progression und Schwere der Erkrankung aus (Schüle et al. 2006).

In dieser Studie wurde der SPRS bei 24 Probanden mit HSP erhoben. Bei 2 gemessenen Probanden (Nr. 5 und Nr. 16. s. Tab. 2) war keine Erhebung möglich, sodass sich die Kohorte aus 11 Frauen und 13 Männern zusammensetzt. Der Mittelwert der Gesamtpunktzahl für die 24 Patienten betrug $20,71 \pm 8,85$ (Tab. 2).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	MW	SD
Funktion																												
Gehstrecke	2	2	2	2	/	2	0	1	2	2	2	2	1	2	1	/	0	2	2	2	1	0	2	2	3	1	1,58	0,78
Gangqualität	3	2	3	3	/	3	2	0	3	2	3	2	1	3	2	/	1	3	3	3	3	1	3	3	3	2	2,38	0,88
Tempo	3	2	3	2	/	3	1	2	4	2	3	3	0	2	4	/	0	3	3	2	2	0	3	3	3	1	2,25	1,15
Treppensteigen	2	2	3	2	/	3	0	2	3	2	2	2	1	2	2	/	0	2	2	2	2	0	2	2	4	2	1,92	0,93
Tempo Treppe	3	2	3	2	/	3	2	3	3	2	3	3	1	3	3	/	0	3	3	2	2	1	3	3	4	3	2,50	0,89
Aufstehen Stuhl	1	2	3	1	/	3	0	2	3	0	1	2	0	2	3	/	0	0	1	2	2	0	1	2	4	0	1,46	1,22
Summe	14	12	17	12	/	17	5	10	18	10	14	14	4	14	15	/	1	13	14	13	12	2	14	15	21	9	12,08	4,94
Spastik & Schwäche																												
Spastik Adduktoren	2	2	3	2	/	3	1	2	3	1	3	2	1	1	1	/	0	2	2	2	2	0	0	3	2	1	1,71	0,96
Spastik Knieflexoren	2	1	2	1	/	3	1	2	3	1	2	1	0	1	2	/	0	2	1	2	1	0	2	2	2	1	1,46	0,83
Parese Adduktoren	2	1	2	1	/	4	1	3	3	0	3	2	1	0	1	/	0	1	2	2	2	0	2	2	3	1	1,63	1,10
Parese Knieflexoren	2	2	2	1	/	3	3	2	4	1	2	1	3	1	1	/	0	1	2	1	1	0	2	1	2	3	1,71	1,0
Summe	8	6	9	5	/	13	6	9	13	3	10	6	5	3	5	/	0	6	7	7	6	0	6	8	9	6	6,50	3,22
Zusatzsymptome																												
Kontrakturen	0	0	0	0	/	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	/	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,13	0,61
Schmerzen	2	2	2	0	/	1	0	0	2	0	1	3	0	0	1	/	0	1	4	1	1	0	4	3	2	0	1,25	1,29
Blase/Mastdarm	1	1	2	2	/	0	0	1	1	0	2	1	0	2	0	/	0	0	2	1	2	0	0	0	0	0	0,75	0,85
Summe	3	3	4	2	/	1	0	1	6	0	3	4	0	2	1	/	0	1	6	2	3	0	4	3	2	0	2,13	1,83
Total	25	21	30	19	/	31	11	20	37	13	27	24	9	19	21	/	1	20	27	22	21	2	24	26	32	15	20,71	8,85

Tab. 2: Erhebung des SPRS aufgeschlüsselt nach Fragen und Probanden. Durch die subjektive Einschätzung von 0 (keine Einschränkung) bis 4 (stärkste Einschränkung) Punkten ergibt sich die mögliche Gesamtpunktzahl von 0 bis 52 Punkten.

3.2.2 Fragebogen zum Ausschluss relevanter Kontraindikationen

Um bereits vor Beginn der Messungen relevante Kontraindikationen zu ermitteln und die betreffenden Probanden und Kontrollen von den Messungen auszuschließen, erhielten alle Teilnehmer vorab den in Anhang 8.2.1 dargestellten Fragebogen. Neben Erkrankungen und Therapien, welche bekanntermaßen mit Neuropathien assoziiert sind (wie z.B. chronischer Alkoholkonsum, Diabetes mellitus oder Chemotherapien), wurden die Teilnehmer auch nach implantierten medizinischen Geräten oder einer möglichen Schwangerschaft befragt. Bei Probanden mit HSP wurden zudem vorab die Familienanamnese und bereits erfolgte molekulargenetische Untersuchungen, sowie deren Ergebnis ermittelt.

3.3 Technische Voraussetzungen

Die Messung der axonalen Erregbarkeit peripherer Nerven zur Beurteilung der Membraneigenschaften erfolgte mittels der von Bostock entwickelten in-vivo-Methode, dem TT (Bostock et al. 1998). Hierfür wurde das entsprechende Programm Qtrac® (Sobell Institute of Neurology, Queen Square, Version 2010) genutzt.

3.3.1 DS5 Isolated Bipolar Constant Current Stimulator

Zur Durchführung einer TT-Messung am humanen Nerven wird ein geeignetes Stimulationsgerät benötigt. In dieser Studie wurde der DS5 Isolated Bipolar Constant Current Stimulator, ein Gleichstromgenerator der Firma Digitimer, genutzt, welcher in Zusammenarbeit mit Bostock für den Gebrauch mit dem Programm Qtrac® entwickelt wurde. Mittels dieses Stimulators kann die Stromstärke zwischen drei verschiedenen Werten (10 mA, 25 mA und 50 mA) variiert werden, wobei die maximale applizierte Stromstärke auf 50 mA bei einer elektrischen Spannung bis zu 120 V limitiert ist. Größe und Dauer der ausgegebenen Stimuli werden automatisch bestimmt. Der DS5 Isolated Bipolar Constant Current Stimulator ist ein CE-zertifiziertes Produkt (CE 0120, Serien-Nr. DS5-158-2009), welches dem Medizinproduktegesetz als Umsetzung der europäischen Richtlinien unterliegt und für die Anwendung am Menschen zugelassen ist. Zur Gewährleistung der Probandensicherheit verfügt er über einen automatischen Strombegrenzer und zusätzlich einen Notausschalter.

3.3.2 Qtrac®-Software

Qtrac® wurde von Bostock als Stimulations- und Auswertungsprogramm für axonale Erregbarkeitsstudien am humanen Nerven in vivo entwickelt. Das Stimulationsprogramm QtracS® dient der Messung und Aufzeichnung der nervalen Erregung nach einem festgelegten Protokoll. Über eine Reihe von Stimulationskanälen, welchen verschiedene Parameter und Eigenschaften zugeordnet werden können, erfolgt die Reizung des humanen Axons. Dabei erfolgt die Berechnung der notwendigen Stromstärke, welche für das Erreichen der zuvor festgelegten Zielantwort notwendig ist. Diese Zielantwort wird in der Regel bei 40% der möglichen Maximalantwort des Axons auf einen Stimulus festgelegt. Zum Erreichen dieser maximalen Antwort, dem CMAP, erfolgt die langsame Erhöhung der Stromstärke um je 3%, bis durch eine weitere Erhöhung des applizierten Reizes keine Änderung der Antwort mehr zu generieren ist. QtracS® ermöglicht es, die notwendige Stromstärke automatisch, aber auch manuell zu verändern (Bostock et al. 1998, Burke et al. 2001). Zur Auswertung der generierten Antwortpotentiale wurde das Plotting-Programm QtracP® entwickelt. Dieses ermöglicht über eine integrierte

statistische Auswertung den Vergleich verschiedener Probanden. Zusätzlich ermöglicht es auch die grafische Darstellung der Ergebnisse.

3.4 Messaufbau und -ablauf

3.4.1 Messaufbau

Im Rahmen der Studie erfolgte die Stimulation des N. medianus. Hierfür wurden zwei Stimulationselektroden über dem Nerven im Bereich des Handgelenkes (beziehungsweise am proximalen Unterarm) als Referenzelektrode angelegt. Die zwei Ableitelektroden wurden über dem Zielmuskel, dem M. abductor pollicis brevis, und dem Daumenendgelenk angebracht. Die in Natriumchlorid getränkte Erdungselektrode wurde eng am Handgelenk befestigt (Abb. 10). Zur Gewährleistung einer guten Stromleitung und zur Reduktion des Elektrodenübergangswiderstandes wurden die Stimulationselektroden mit entsprechender Elektrodenpaste versehen. Ein besonderer Schwerpunkt im Verlauf der Messungen lag auf der Vermeidung von Leitungsbrücken zwischen der Stimulations- und der Erdungselektrode. Zudem erfolgte die Temperaturmessung der Haut am Stimulationsort vor und nach der elektrophysiologischen Messung. Bei initialen Temperaturen $< 32,0^{\circ}\text{C}$ erfolgte die Aufwärmung des Unterarmes, insbesondere durch Händewaschen mit warmen Wasser. Um während des Messablaufes eine Abkühlung der Hauttemperatur zu verringern, wurde zudem der zu messende Arm bedeckt und Zugluft vermieden.

Ursprünglich war zusätzlich die distale Stimulation des N. tibialis, als motorischer Nerv der primär betroffenen Extremität, mit Ableitung der Antwort über dem M. abductor hallucis brevis geplant. Dies musste jedoch aufgrund der gesteigerten Spastikinduktion mit begleitenden starken Schmerzen und Beeinflussung der Messung bei Probanden mit HSP verworfen werden.

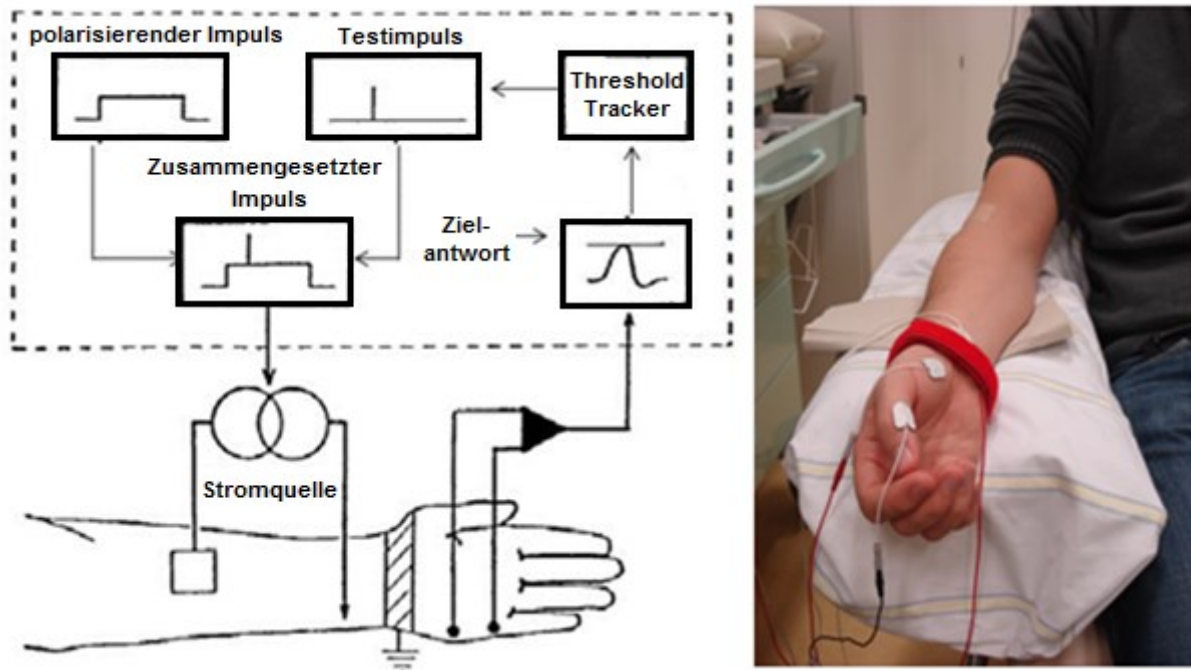


Abb. 10: Versuchsaufbau einer TT-Messung; hier beispielhaft mit Stimulation des N. ulnaris und Ableitung über dem M. abductor digiti minimi (modifiziert nach Bostock et al. 1998). Rechts Versuchsaufbau am Probanden mit Stimulation des N. medianus und Ableitung über dem M. abductor pollicis brevis.

3.4.2 Messablauf

Durch den DS5 Isolated Bipolar Constant Current Stimulator erfolgte über die Stimulationselektroden die Applikation von Testimpulsen mit einer maximalen Stromstärke von ± 50 mA und einer Spannung von ± 100 V. Hierdurch entstand eine Reizung des N. medianus, welche über die Generierung von Aktionspotentialen und nachfolgender saltatorischer Erregungsleitung zu einer Kontraktion des M. abductor pollicis brevis führte. Diese wurde über die Ableitelektroden in das Messprogramm Qtrac® eingespeist und graphisch dargestellt. Anschließend erfolgte der automatisierte Vergleich mit der zuvor festgesetzten Zielantwort von 40% des CMAP. Über das registrierte Fehlersignal aus der Differenz des Ziel- und Istwertes erfolgte die Adaption der Amplitude des nächsten Testimpulses. Im Verlauf schloss sich das festgelegte Messprotokoll an. Während der gesamten Messung bestand die Möglichkeit, die Stimulation über den Notausschalter des DS5 Isolated Biopolar Constant Current Stimulator zu beenden.

3.4.3 Messprotokoll

Für diese Studie wurde das halbautomatische, computerkontrollierte TROND-Protokoll genutzt. Dieses erlaubt es, verschiedene Parameter zur axonalen Erregbarkeit innerhalb eines kurzen Zeitraumes zu bestimmen. Dieses Protokoll wurde explizit für die klinische Anwendung mit einer Dauer von 10 bis 15 Minuten pro Messung und Proband entworfen (Burke et al. 2001, Krishnan et al. 2009). Es umfasst neben der Bestimmung der notwendigen Stimulusstärke zum Erreichen der festgesetzten Zielantwort, der Latenzzeit, der Spannung und der Verzögerungszeit zwischen zwei Impulsen die bereits oben aufgeführten 4 Messabschnitte (Abb. 11). Der Beginn des Protokolls zeichnet sich durch die Generierung der Stimulus-response-curve aus. Hierbei wird das Axon mit je 0,2 ms (lila Kurve im Abschnitt A) und 1 ms (grüne Kurve im Abschnitt A) Stimulusdauer und in 6%-Schritten ansteigender Stimulusstärke gereizt. Anhand der, in diesem Messabschnitt ermittelten, Maximalantwort (in Form des CMAP auf einen supramaximalen Reiz) werden die mit 40% definierte Zielantwort festgelegt und die Chronaxie und Rheobase ermittelt.

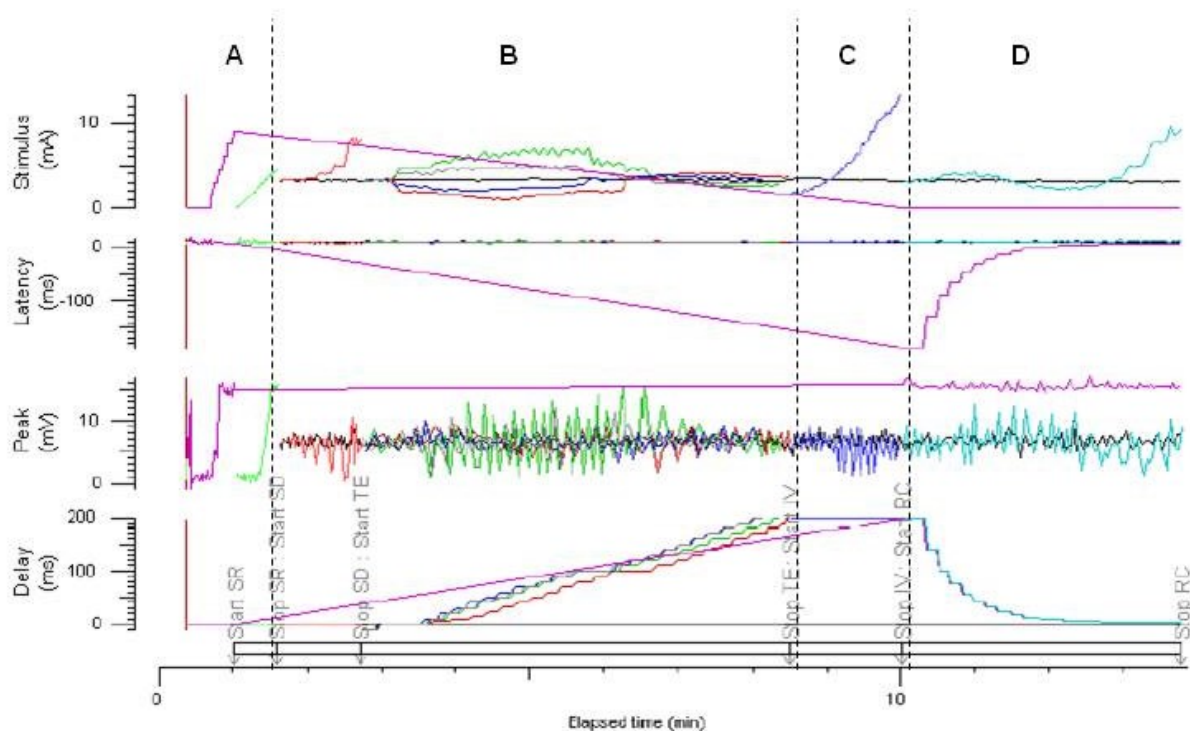


Abb. 11: Messablauf nach dem TROND-Protokoll mit Darstellung der Stromstärke in mA, Latenz in ms, Spannung in mV und der Stimulusverzögerung in ms. A: Stimulus-response-curve, B: Threshold electrotonus, C: Current threshold relationship, D: Recovery cycle

Hiernach folgt der TE (Abschnitt B) mit Applikation depolarisierender und hyperpolarisierender unterschwelliger Reize. Der IV wird im Abschnitt C widergespiegelt, der am Ende eines 200 ms andauernden Impulses, die Reaktion des Axon auf de- und hyperpolarisierende Reize darstellt. Der RC (Abschnitt D) dient der Visualisierung der Refraktärität des Axons (Kiernan et al. 2000).

3.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte über das von Bostock entwickelte Plotting-Programm QtracP®. Hierbei erfolgte automatisiert die Testung der Normalität mit dem Lilliefors-Test. Dieser zeichnet sich, im Vergleich zu anderen Methoden der Normalverteilungsbestimmung (zum Beispiel den Shapiro-Wilk-Test), durch eine geringere Teststärke für kleinere Stichproben aus. Jedoch wurde in den bisherigen axonalen Erregbarkeitstudien, zum Beispiel bei Coriat (Coriat et al. 2014), durchgehend QtracP® mit der vorgegebenen statistischen Beurteilung genutzt. Um eine Vergleichbarkeit der im Rahmen dieser Studie erworbenen Daten mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen zu gewährleisten, wurde ebenfalls das vorgegebene Auswertungsprogramm genutzt. Entsprechend den Ergebnissen des Normalitätstestes erfolgte der Gruppenvergleich der unabhängigen Variablen für normalverteilte Parameter mit dem „unpaired t-Test“ und für nicht-normalverteilte Parameter mit dem Mann-Whitney-U-Test. Das Signifikanzniveau für diese Auswertungen wurde bei $\alpha = 0,05$ gesetzt. Die graphische Darstellung der einzelnen TT-Abschnitte erfolgte ebenfalls über QtracP®.

Für weitere Grafiken wurden das Statistikprogramm SPSS® Version 21 sowie Microsoft Excel® Version 2010 genutzt.

3.5.1. Zusammenhang mit der Krankheitsschwere

Es erfolgte die Überprüfung eines Zusammenhanges zwischen Krankheitsschwere und Messparametern bei 24 Patienten mittels Korrelationsanalyse und linearer Regression. Als Ausdruck der Krankheitsschwere wurde der SPRS genutzt.

Es erfolgte im Vorfeld die Überprüfung der Normalität mit dem Shapiro-Wilk-Test, da dieser sich insbesondere bei kleineren Kohorten mit $n < 50$, durch eine hohe Teststärke auszeichnet.

Für die Korrelationsanalyse wurde, für Variablen mit nachgewiesener Normalität, ausschließlich der Pearson-Koeffizient, für nicht-normalverteilte Variablen der Spearman-Rho-Koeffizient genutzt. Zusätzlich wurde bei diesen der Pearson-Koeffizient mit angegeben, um den, durch die Rangkorrelation möglichen, Informationsverlust besser einschätzen zu können. Aufgrund der Nähe der erhobenen Korrelationskoeffizienten zum Regressionskoeffizienten β , wurde auch bei nicht-normalverteilten Variablen eine lineare Regression durchgeführt. Für alle Werte wurde ein Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ festgelegt. Genannt werden im Ergebnisteil nur Parameter, welche einen signifikanten Zusammenhang in der Korrelation beziehungsweise in der linearen Regression zeigten.

Um eine Aussage über die Güte des konstruierten Modells zu treffen, wurde, aufgrund der eingeschränkten Aussagekraft des Bestimmtheitsmaßes R^2 bei multiplen Variablen, der Koeffizient des korrigierten R^2 genutzt. Auch wenn in der vorliegenden Regressionsanalyse eine einzige unabhängige Variable (Strength-duration time constant) integriert wurde, beziehen sich die Aussagen zum Maß der Erklärungskraft des konstruierten Modells auf die Ergebnisse des korrigierten R^2 .

4. Ergebnisse

4.1 Veränderungen der axonalen Erregbarkeit der Gesamtpopulation

Die Daten von 26 Probanden mit HSP und 21 gesunden Kontrollen flossen in die Analyse ein. Weitere 4 Probanden und 6 Kontrollen wurden, aufgrund technischer Schwierigkeiten während der Messung beziehungsweise Abbruch dieser, von der Auswertung ausgeschlossen. Um den Einfluss des Geschlechts auf die statistische Analyse zu minimieren, wurde im Programm QtracP® die Geschlechterkompensation genutzt. Zudem wurde auch eine Kompensation von Alters- und Temperaturunterschieden durchgeführt. Im Folgenden ist die Auswertung entsprechend der einzelnen Protokollabschnitte aufgeführt.

4.1.1 Strength-duration relationship

Der Abschnitt der Strength-duration relationship spiegelt mit ihren Veränderungen den nodalen Na_p -Strom wider. Die TSD, als Ausdruck für die minimale Zeit über die ein Stimulus mit doppelter Rheobasenstärke fließen muss, um gerade noch erregend zu wirken, zeigte sich in der HSP-Gruppe mit 0,5347 ms signifikant verlängert (Tab. 3). Der Anstieg der stimulus-response-curve (Abb. 12), welche die Rheobase darstellt, zeigte sich in beiden Gruppen ohne Unterschiede.

	Kontrollen MW \pm SD	HSP MW \pm SD	Signifikanzwert
Strength-duration time constant (ms)	0,50 \pm 0,07	0,53 \pm 0,15	$p < 0,01$
Rheobase (mA)	3,22 \pm 1,27	3,41 \pm 1,64	$p > 0,80$

Tab. 3: Parameter der Strength-duration relationship mit entsprechenden Signifikanzwerten

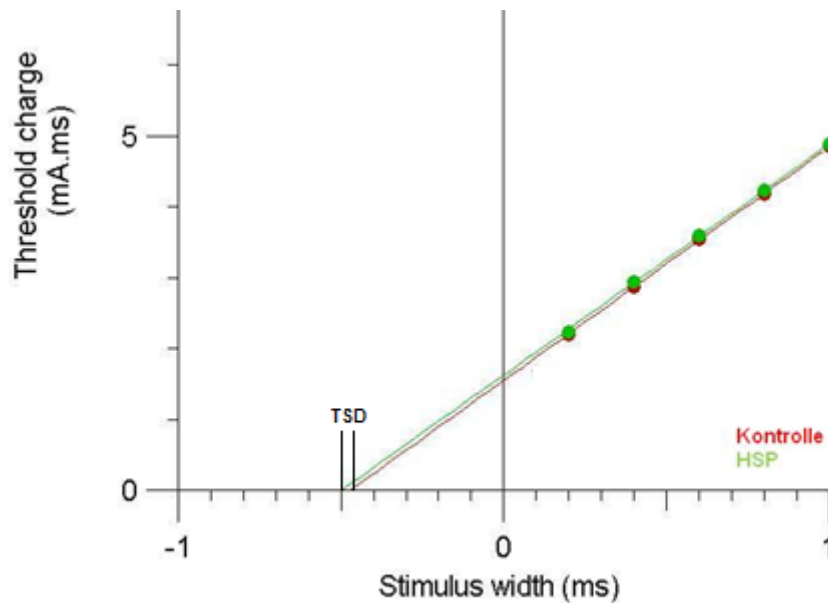


Abb. 12: Strength-duration relationship im Vergleich zwischen Probanden (grün) und Kontrollen (rot).

4.1.2 Threshold electrotonus

Der TE spiegelt die internodale Leitfähigkeit des peripheren Nervs wider, deren Veränderungen durch die Threshold reduction (TR) visualisiert werden können (Abb. 13). In der HSP-Gruppe zeigte sich als Reaktion auf einen depolarisierenden Impuls bei 40 bis 60 ms Stimulusverzögerung (TEd40-60ms) sowie im Bereich der größten Antwort auf einen depolarisierenden Reiz (TEdpeak) eine signifikante Erhöhung der TR. Dies beschreibt die Reduktion des Schwellenwertes im Sinne einer Erhöhung der axonalen Erregbarkeit als Folge einer Depolarisation. Zusätzlich zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Accommodation half-time (Tab. 4) im Vergleich zu den gesunden Kontrollen.

	Kontrollen MW \pm SD	HSP MW \pm SD	Signifikanzwert
TEd(10-20ms)	67,95 \pm 3,66	69,83 \pm 4,38	p = 0,12
TEd(40-60ms)	48,96 \pm 2,96	54,20 \pm 5,05	p < 0,001
TEd(90-100ms)	44,00 \pm 2,78	45,38 \pm 3,60	p = 0,16
TEd(peak)	67,50 \pm 3,36	70,22 \pm 4,78	p < 0,05
TEd20(peak)	38,85 \pm 3,01	39,37 \pm 3,30	p = 0,59
TEd40(Accom)	24,59 \pm 4,46	24,28 \pm 3,16	p = 0,68
TEh(10-20ms)	- 73,74 \pm 4,04	- 72,12 \pm 4,44	p = 0,20
TEh(20-40ms)	- 92,54 \pm 6,22	- 90,81 \pm 6,88	p = 0,38
TEh(90-100ms)	- 116,50 \pm 15,72	- 115,09 \pm 16,32	p = 0,87
TEh(slope 101-140ms)	2,08 \pm 0,30	2,07 \pm 0,32	p = 0,90
TEh(overshoot)	17,62 \pm 4,05	19,02 \pm 4,98	p = 0,31
S2 accommodation	24,14 \pm 3,99	24,26 \pm 3,06	p = 0,53
Accommodation half-time	38,75 \pm 3,43	42,55 \pm 3,35	p < 0,001

Tab. 4: Parameter des TE mit entsprechenden Signifikanzwerten

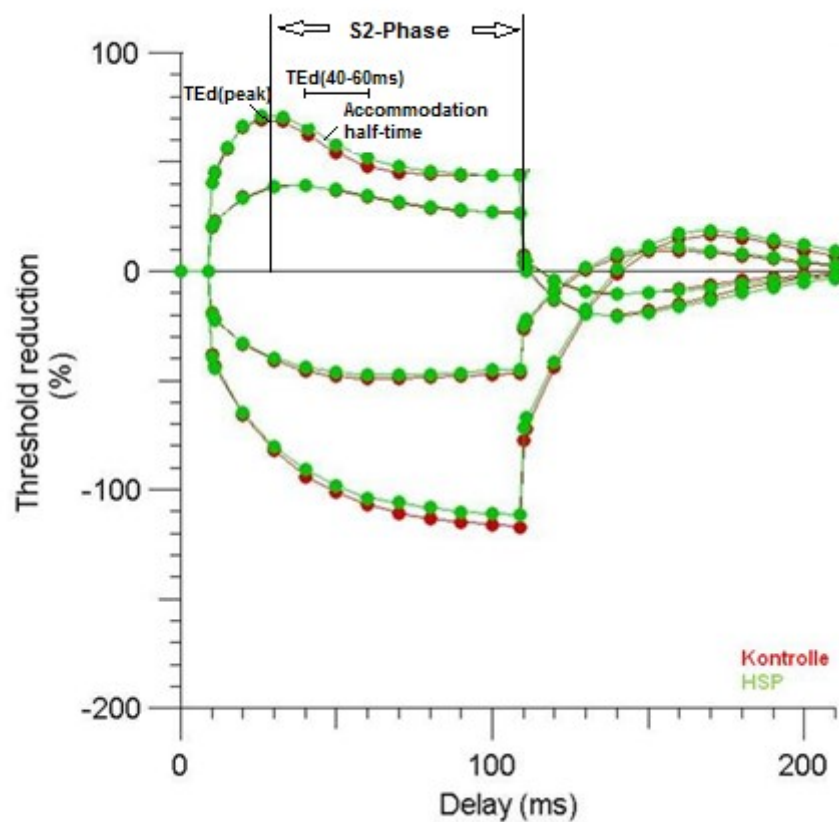


Abb. 13: TE im Vergleich zwischen Probanden (grün) und Kontrollen mit Zunahme der TR als Reaktion auf einen depolarisierenden Impuls

4.1.3 Current threshold relationship

Der IV stellt die Erregungsrückbildung des humanen Axons in Abhängigkeit von der Gleichrichterfunktion dar (Abb. 14). Im Vergleich zwischen Probanden und Kontrollen war in diesem Messabschnitt eine leichte Rechtsverschiebung der Probandenkurve im Bereich der I_h -Funktion erkennbar, jedoch ohne signifikanten Unterschied (Tab. 5).

	Kontrollen MW \pm SD	HSP MW \pm SD	Signifikanzwert
Resting I/V slope	0,61 \pm 0,06	0,62 \pm 0,07	p = 0,47
Minimum I/V slope	0,25 \pm 0,06	0,26 \pm 0,08	p = 0,61
Hyperpolarization I/V slope	0,88 \pm 0,33	1,78 \pm 0,09	p = 0,08

Tab. 5: Parameter des IV mit entsprechenden Signifikanzwerten

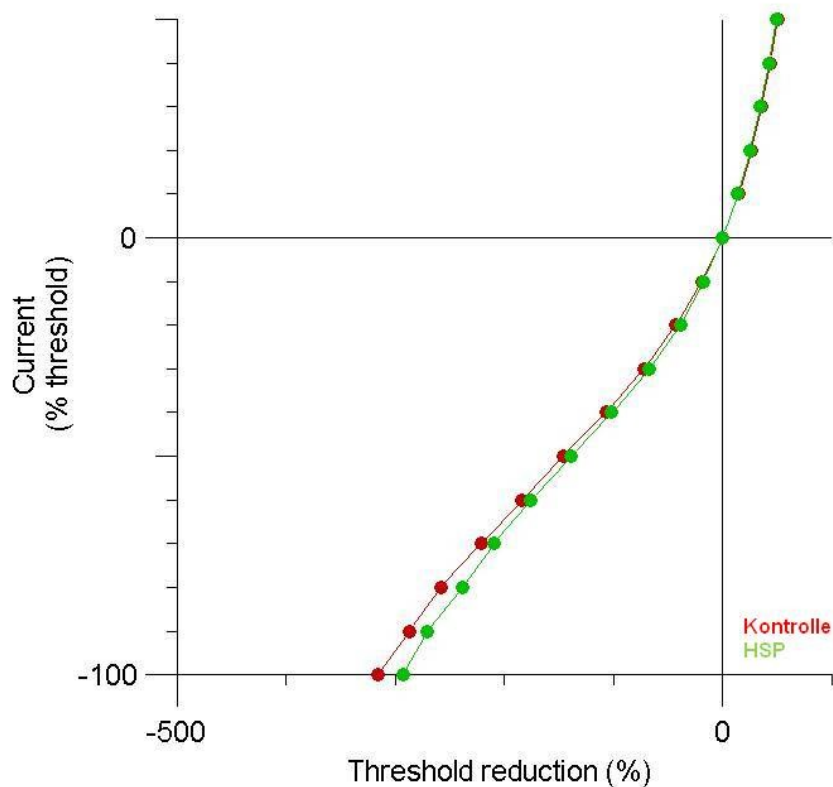


Abb. 14: IV im Vergleich zwischen Probanden (grün) und Kontrollen (rot)

4.1.4 Recovery cycle

Der RC visualisiert die Prozesse am menschlichen Axon als Folge eines singulären supramaximalen Impulses. Im Vergleich zwischen Kontrollen und Probanden imponierte eine Rechtsverschiebung der Probandenkurve (Abb. 15). Zudem kam es zu einer signifikanten Senkung der Subexcitability (%). Der Übertritt in die untererregbare Phase (mit Erhöhung des Schwellenwertes) erfolgte in der Probandengruppe erst bei höheren Interstimulusintervallen (Tab. 6).

	Kontrollen MW \pm SD	HSP MW \pm SD	Signifikanzwert
RRP	3,09 \pm 1,11	3,21 \pm 1,15	$p = 0,08$
Refractoriness at 2ms	88,67 \pm 16,94	85,31 \pm 37,61	$p = 0,75$
Refractoriness at 2,5ms	31,34 \pm 20,10	30,18 \pm 36,51	$p = 0,95$
Superexcitability (%)	- 22,46 \pm 7,08	- 25,45 \pm 6,16	$p = 0,18$
Superexcitability at 5ms	- 24,86 \pm 6,12	- 25,38 \pm 8,96	$p = 0,71$
Superexcitability at 7ms	- 21,89 \pm 5,49	- 25,42 \pm 6,88	$p = 0,09$
Subexcitability (%)	17,73 \pm 5,24	14,16 \pm 4,18	$p < 0,05$

Tab. 6: Parameter des RC mit entsprechenden Signifikanzwerten

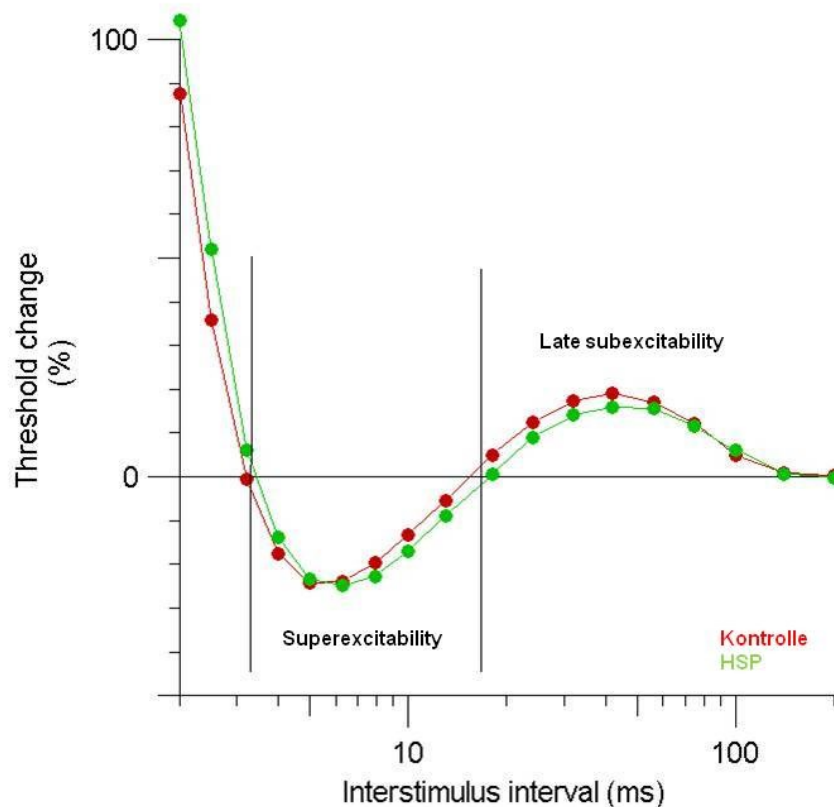


Abb. 15: RC im Vergleich zwischen Probanden (grün) und Kontrollen (rot)

4.2 Veränderungen der axonalen Erregbarkeit bei SPG4-HSP

In der Gruppe der Probanden fanden sich 9 Personen mit einer nachgewiesenen SPG4-Mutation.

4.2.1 Vergleich der SPG4-HSP gegen Kontrollen

Im Vergleich der SPG4-positiven Probanden gegen die gesunden Kontrollen zeigten sich signifikante Veränderungen in allen 4 Messabschnitten. In dem Abschnitt der strength-duration relationship war neben einer verlängerten TSD auch eine erniedrigte Rheobase auffällig (Tab. 7), welche sich im Anstieg der stimulus-response-curve widerspiegelte (Abb. 16). Im TE zeigten sich die Werte nach einem depolarisierenden Impuls ebenso erhöht, wie die Accommodation half-time. Im IV war eine Rechtsverschiebung der SPG4-Kurve im einwärtsgleichrichtenden Bereich, sowie eine leichte Erhöhung des Minimum IV slope auffällig. Im RC war eine Rechtsverschiebung der SPG4-Kurve mit einem verzögerten Übergang aus der über- in die untererregbare Phase objektivierbar.

	Kontrollen MW ± SD	SPG4 MW ± SD	Signifikanzwert
TSD			
Strength-duration time constant (ms)	0,50 ± 0,07	0,60 ± 0,11	<i>p < 0,001</i>
Rheobase (mA)	3,22 ± 1,27	2,42 ± 1,70	<i>p < 0,05</i>
TE			
TEd(10-20ms)	67,95 ± 3,66	71,53 ± 4,48	<i>p < 0,05</i>
TEd(40-60ms)	48,96 ± 2,96	57,50 ± 4,99	<i>p < 0,001</i>
TEd(90-100ms)	44,00 ± 2,78	47,77 ± 3,12	<i>p < 0,01</i>
TEd(peak)	67,50 ± 3,36	72,68 ± 4,47	<i>p < 0,01</i>
Accommodation half-time	38,75 ± 3,43	43,74 ± 3,86	<i>p < 0,01</i>
IV			
Minimum I/V slope	0,25 ± 0,06	0,31 ± 0,08	<i>p < 0,05</i>
RC			
Superexcitability at 7ms	- 21,89 ± 5,49	- 30,31 ± 8,34	<i>p < 0,05</i>
Subexcitability (%)	17,73 ± 5,24	11,24 ± 3,09	<i>p < 0,05</i>

Tab. 7: Signifikant veränderte Parameter der SPG4-positiven Probanden

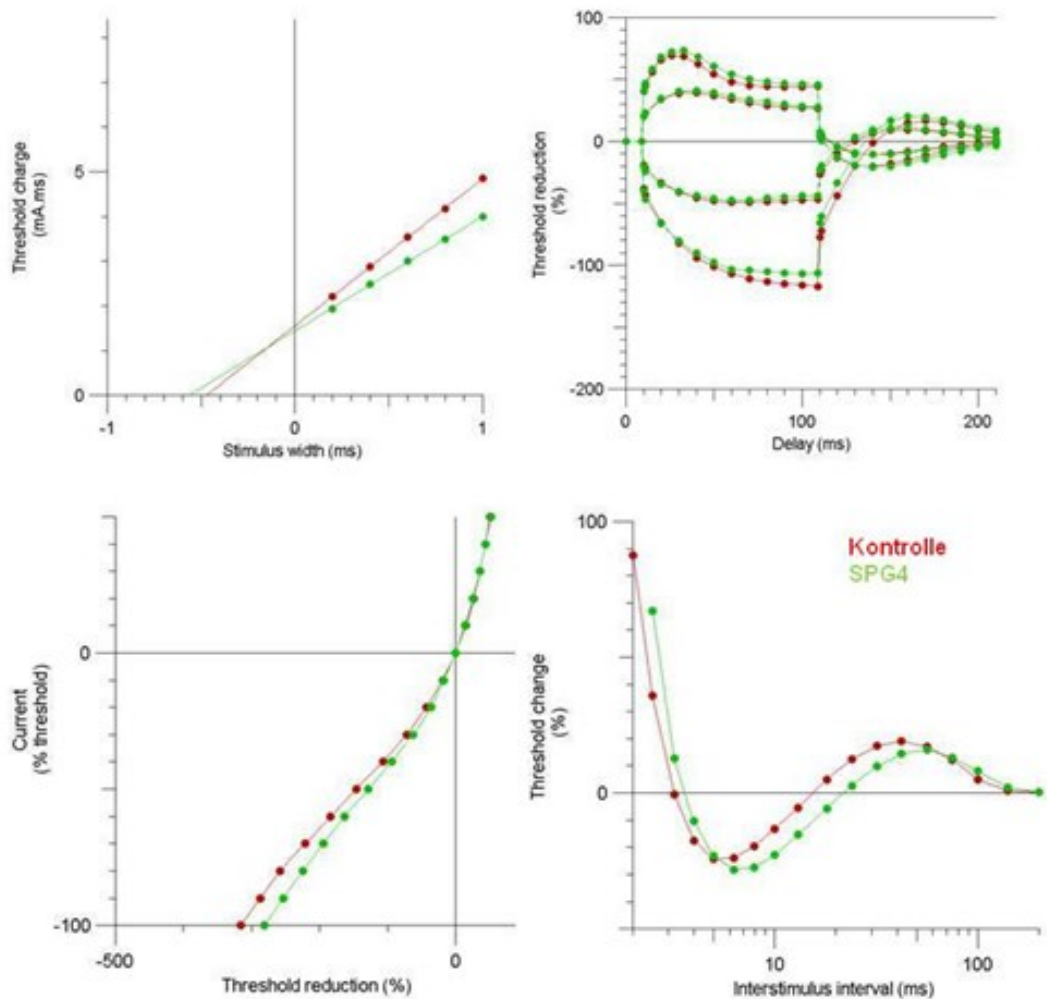


Abb. 16: alle 4 Messabschnitte im Vergleich zwischen SPG4-postiven Probanden (grün) und Kontrollen (rot)

4.2.2 Vergleich der SPG4-HSP gegen Nicht-SPG4-HSP

Im Vergleich der SPG4-positiven Probanden zu den weiteren, SPG4-negativen Probanden ohne oder mit einem anderen Mutationsnachweis imponierte eine signifikante Verlängerung der Chronaxie bei Reduktion der Rheobase. Zudem zeigte sich eine Zunahme der Stimulusverzögerung zwischen 40 und 60 ms sowie 90 und 100 ms auf einen depolarisierenden Puls (Tab. 8). Eine Rechtsverschiebung der SPG4-Kurve im RC verblieb ohne Signifikanz (Abb. 17).

	HSP MW \pm SD	SPG4 MW \pm SD	Signifikanzwert
TSD			
Strength-duration time constant (ms)	0,48 \pm 0,17	0,60 \pm 0,11	<i>p</i> < 0,001
Rheobase	3,71 \pm 1,57	2,42 \pm 1,68	<i>p</i> < 0,01
TE			
TEd(40-60ms)	52,68 \pm 4,41	57,50 \pm 4,99	<i>p</i> < 0,05
TEd(90-100ms)	44,30 \pm 3,33	47,77 \pm 3,12	<i>p</i> < 0,05

Tab. 8: Signifikant veränderte Parameter der SPG4-positiven Probanden im Vergleich zur restlichen, SPG4-negativen HSP-Gruppe

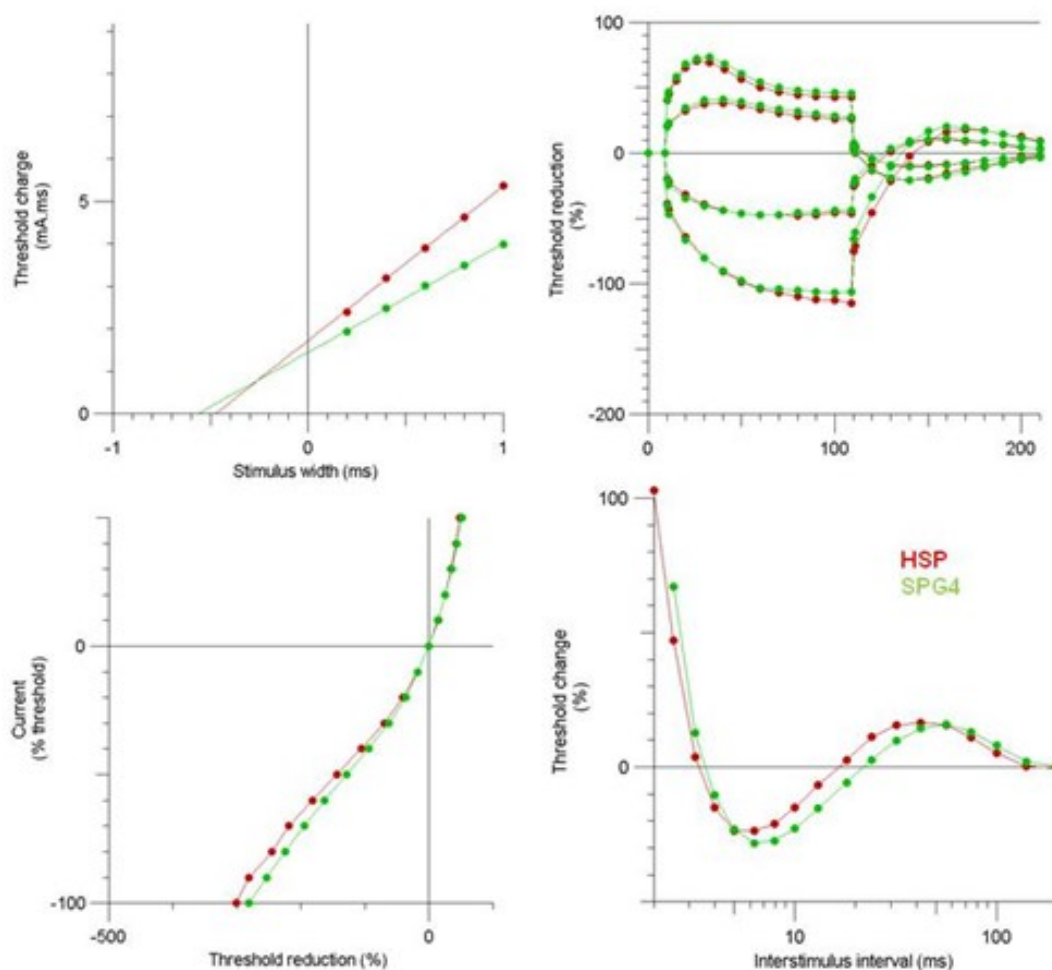


Abb. 17: alle 4 Messabschnitte im Vergleich zwischen SPG4-positiven Probanden (grün) und den restlichen, SPG4-negativen HSP-Probanden

4.2.3 Vergleich der Nicht-SPG4-HSP gegen Kontrollen

Im Vergleich der SPG4-negativen HSP-Probanden mit gesunden Kontrollen zeigten sich TEd(40-60ms) sowie Accommodation half-time in der HSP-Gruppe erhöht. Zudem war eine signifikante Reduktion der Subexcitability (%) mit verzögertem Übertritt in die untererregbare Phase erkennbar.

	Kontrollen MW \pm SD	HSP MW \pm SD	Signifikanzwert
TE			
TEd(40-60ms)	48,96 \pm 0,66	52,68 \pm 1,07	$p < 0,01$
Accommodation half-time	38,75 \pm 0,77	41,95 \pm 0,75	$p < 0,01$
RC			
Subexcitability (%)	18,53 \pm 0,91	15,36 \pm 1,21	$p < 0,05$

Tab. 9: Signifikant veränderte Parameter der SPG4-negativen Probanden (HSP) im Vergleich zur gesunden Kontrollen

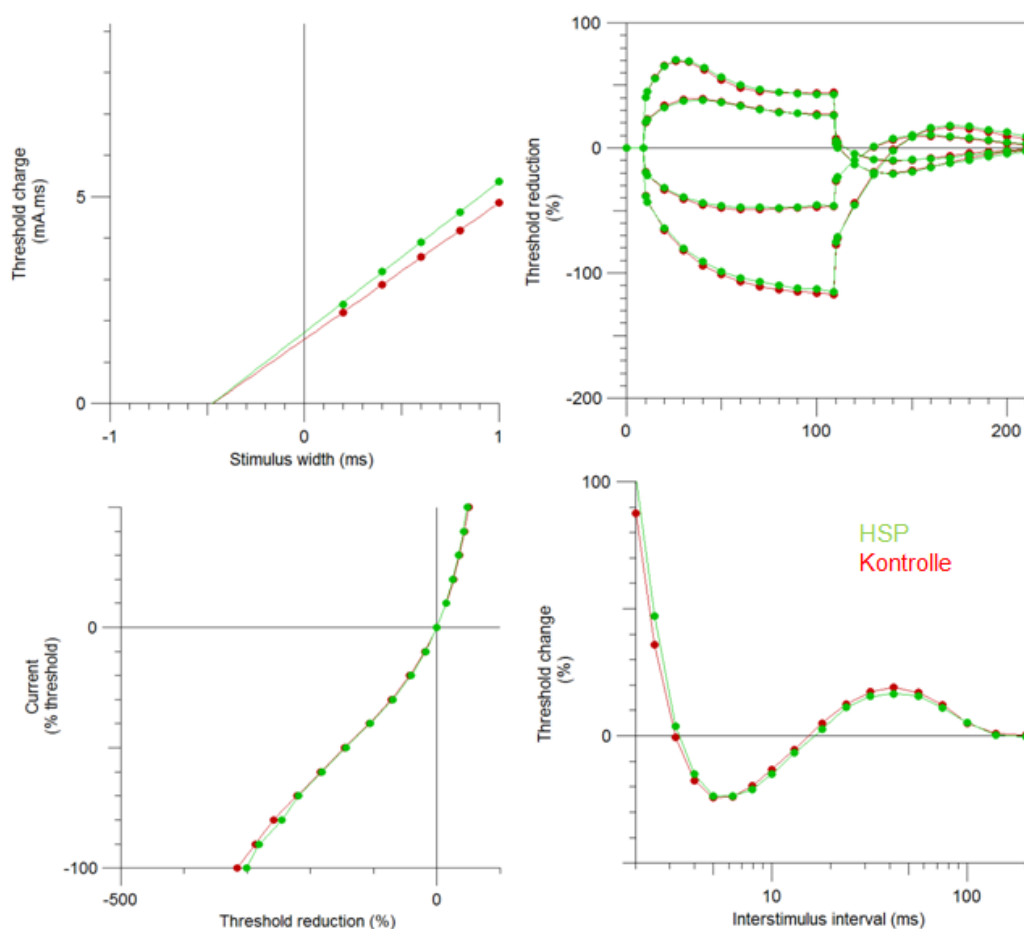


Abb. 18: alle 4 Messabschnitte im Vergleich zwischen SPG4-negativen Probanden (grün) und den gesunden Kontrollen (rot)

4.3 Zusammenhang zwischen Krankheitsschwere und Messparametern des TT

In der Korrelationsanalyse (Tab.10) zeigte sich ein signifikant negativer Zusammenhang zwischen dem nicht-normalverteilten Parameter Strength-duration time constant und der Erkrankungsschwere.

	Korrelationskoeffizient	Signifikanzwert
Strength-duration time constant	- 0,476 (Pearson) - 0,469 (Spearman)	$p < 0,05$ $p < 0,05$

Tab. 10: Korrelationsanalyse des Parameters Strength-duration time constant mit Korrelationskoeffizient nach Pearson sowie dem Korrelationskoeffizienten nach Spearman

In der Regressionsanalyse (Tab. 11) war ebenfalls ein signifikant linearer Zusammenhang zwischen der Strength-duration time constant und der Krankheitsschwere nachweisbar.

	R^2	Korrigiertes R^2	Regressionskoeffizient B	β -Koeffizient	Signifikanzwert
Strength-duration time constant	0,227	0,192	- 0,009	- 0,476	$p < 0,05$

Tab. 11: Lineare Regression des Parameters Strength-duration time constant

5. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden pathologische Veränderungen an peripheren Nerven bei Patienten mit einer HSP untersucht. Das Ziel dieser Arbeit war es, subklinische axonale Schädigungen peripherer Nerven im Rahmen der primär durch den Befall des 1. Motoneurons gekennzeichneten HSP zu erfassen, die Korrelation mit der Gesamtbeeinträchtigung der Patienten zu analysieren und Parallelen zu Pathologien anderer Motoneuronerkrankungen zu suchen.

5.1 Veränderungen der axonalen Erregbarkeit

Der Vergleich zwischen Probanden mit bekannter HSP und gesunden Kontrollen wies zahlreiche signifikante Unterschiede in der axonalen Erregbarkeit des N. medianus auf. Sowohl im Gesamtgruppenvergleich als auch in den Untergruppenanalysen fanden sich, trotz der phäno- und genotypischen Heterogenität der Erkrankung, Hinweise auf Veränderungen auf der Kanalebene mit daraus resultierenden Erregbarkeitsveränderungen. Insbesondere scheinen eine erhöhte Na_p -Leitfähigkeit und eine Reduktion der internodalen K_s -Leitfähigkeit, beziehungsweise ein relativer Mangel an K_s -Kanälen, eine entscheidende Rolle zu spielen.

5.1.1 Strength-duration relationship

Im Messabschnitt der Strength-duration relationship konnten Veränderungen bei HSP-Patienten als Hinweis auf eine Affektion des nodalen Na_p -Stroms nachgewiesen werden. Die TSD als Ausdruck der Chronaxie war sowohl im Gesamtvergleich, als auch bei Probanden mit nachgewiesener SPG4-Mutation im Vergleich zu gesunden Kontrollen und zu SPG4-negativen Probanden signifikant erhöht. Bei SPG4-negativen Probanden im Vergleich mit gesunden Kontrollen konnte dies nicht dargestellt werden. In einer Studie mit Messungen der axonalen Erregbarkeit in einer kleinen Kohorte von 11 Patienten mit nachgewiesener SPG4-Mutation konnte ebenfalls eine signifikante Erhöhung der TSD nachgewiesen werden (Kumar et al. 2012). Auch bei der ALS ist dieser Effekt nachweisbar (Mogyoros et al. 1998a, Mogyoros et al. 1998b, Vucic und Kiernan 2006). Zudem ist im Vergleich der SPG4-

positiven Probanden gegen Kontrollen beziehungsweise gegen SPG4-negative Probanden eine signifikante Reduktion der Rheobase objektivierbar, sodass zur Auslösung eines AP eine reduzierte Stromintensität im Vergleich zur Kontrollgruppe notwendig ist. Diese negative Korrelation zwischen verlängerter Chronaxie und reduzierter Rheobase gilt als Ausdruck einer gesteigerten nodalen Na_p -Leitfähigkeit (Burke et al. 2001). Generell dienen sowohl die TSD, als auch die Rheobase als sensitive Parameter für eine Veränderung der Nerven geometrie im Sinne eines axonalen Verlustes oder eines demyelinisierenden Prozesses, sodass diese Ergebnisse als Hinweis auf eine Veränderung der Nervenstruktur im Rahmen der HSP diskutiert werden können.

5.1.2 Threshold electrotonus

Durch Veränderungen in der TR konnten entsprechende, der HSP zugrunde liegende, Effekte auf die internodale Leitfähigkeit der peripheren Nerven nachgewiesen werden. Im Vergleich der Probanden mit den gesunden Kontrollpersonen zeigten sich, in mehreren Parametern, Veränderungen der Membranerregbarkeit als Reaktion auf einen depolarisierenden Reiz. Eine signifikante Erhöhung bei 10 - 20 ms Stimulusverzögerung (TEd (10-20ms)) war aber ausschließlich bei den SPG4-positiven Probanden im Vergleich gegen gesunde Kontrollpersonen objektivierbar. Zusätzlich dazu konnte, sowohl im Gesamtvergleich, als auch im Vergleich der SPG4-positiven Probanden gegen die gesunden Kontrollpersonen, beziehungsweise SPG4-negative Probanden, eine signifikante Erhöhung bei einer Stimulusverzögerung von 40 - 60 ms (TEd (40-60ms)) nachgewiesen werden. Diese zeigte sich auch im Vergleich der SPG4-negativen Probanden mit den gesunden Kontrollpersonen. Bei 90 - 100 ms Stimulusverzögerung (TEd (90-100ms)) zeigte sich eine signifikante Zunahme im Vergleich der SPG4-positiven Probanden gegen gesunde Kontrollpersonen sowie gegen SPG4-negative Probanden. Die größte Antwort auf einen depolarisierenden Impuls (TEd (peak)) war sowohl im Gesamtvergleich der HSP-Probanden gegen gesunde Kontrollpersonen, als auch bei den SPG4-positiven Probanden im Vergleich zu den gesunden Kontrollpersonen signifikant erhöht.

Zusammenfassend ist anhand dieser Veränderungen bei den HSP-Probanden eine größere Schwellenwertreduktion, d.h. ein niedrigerer Schwellenwert und damit eine gesteigerte Erregbarkeit auf einen depolarisierenden Impuls hin nachweisbar. Erklärbar ist dies durch eine reduzierte internodale Leitfähigkeit, beziehungsweise durch einen Mangel der K_s -Kanäle und durch eine Zunahme von Na_p . Diese Veränderungen konnten bereits bei der ALS nachgewiesen werden (Vucic und Kiernan 2006, Krishnan et al. 2009, Shibuta et al. 2013). Gestützt wird die Annahme einer reduzierten internodalen Leitfähigkeit der K_s -Kanäle bei der HSP durch eine signifikante Erhöhung der Accomodation half-time im Vergleich der HSP-Probanden (inklusive der SPG4-positiven und SPG4-negativen in Einzelvergleichen) gegen gesunde Kontrollpatienten. Auch diese Veränderung wird mit einer Funktionsstörung der K_s -Kanäle assoziiert (Casanova et al. 2014).

5.1.3 Current threshold relationship

Mit Hilfe des IV sind Rückschlüsse auf die Erregungsrückbildung im humanen Axon und deren Abhängigkeit von der nodalen und internodalen Gleichrichterfunktion möglich. Letztlich entspricht dieser Messabschnitt einem Längsschnitt der S3-Phase des TE nach einem 220 ms andauernden, unterschwelligen Impuls. Im Vergleich aller HSP-Probanden sowie betont der SPG4-positiven Probanden gegen gesunde Kontrollpersonen beziehungsweise gegen SPG4-negative Probanden war eine klare Rechtsverschiebung und damit ein steilerer Kurvenanstieg erkennbar. Diese Veränderung war auch im Vergleich der SPG4-negativen Probanden gegen gesunde Kontrollpersonen nachweisbar, jedoch in deutlich geringer Ausprägung. In diesem Bereich des Kurvenanstiegs spiegelt sich die Reaktion der I_h als Antwort auf hyperpolarisierende Impulse wieder. SPG4-positive Probanden zeigten gegenüber den gesunden Kontrollpersonen eine signifikante Erhöhung des Minimum I/V slope. Im Vergleich der Gesamt-HSP-Gruppe gegen gesunde Kontrollen war zudem eine nicht signifikante Erhöhung des Hyperpolarisation I/V slope und Minimum I/V slope mit entsprechender konsekutiver Rechtsverschiebung des Kurvenanstiegs erkennbar. Dies ist Ausdruck einer nicht signifikanten, aber relevanten Erhöhung der einwärtsgleichrichtenden Eigenschaften der axonalen Membran bei den HSP-Patienten (Jankelowitz et al. 2007, Krishnan et al. 2009). Ein steilerer Kurvenanstieg

war auch im Vergleich der SPG4-positiven-Gruppe gegen die Nicht-SPG4-positive Gruppe nachweisbar.

5.1.4 Recovery Cycle

Durch den RC konnten Veränderungen der Vorgänge an der Axonmembran nach einem kurzen, singulären, supramaximalen Impuls dargestellt werden. In den Vergleichen zwischen HSP-Probanden und gesunden Kontrollpersonen ließ sich eine nicht-signifikante Erhöhung der relativen refraktären Periode (RRP), als Hinweis auf ein längeres Verbleiben der Zelle in der relativen Refraktärzeit nachweisen. Erklärbar ist dies durch eine verlängerte Rückbildung der Inaktivierung von Na^+ -Kanälen (Burke et al. 2001). Im Vergleich zwischen SPG4-positiven Probanden und gesunden Kontrollen war zudem eine signifikant erhöhte Superexcitability at 7ms als Ausdruck der höheren Erregbarkeit des Axons nach Beendigung der Refraktärzeit auffällig. Auch war dies, jedoch nicht signifikant, im Gesamtvergleich alle HSP-Probanden gegen die gesunden Kontrollpersonen nachvollziehbar. Diese Veränderung geht mit einer durch die Hyperpolarisation ausgelösten Inaktivierung paranodaler K_f -Kanäle einher (Burke et al. 2001, Kuwabara und Misawa 2014). Des Weiteren imponierte in allen Gruppen eine Reduktion der Subexcitability (%), der Phase der Untererregbarkeit. Durch die vorangegangene Depolarisation kommt es zunächst zu einer Aktivierung nodaler K_s -Kanäle, welche sich in der untererregbaren Phase langsam schließen (Kuwabara und Misawa 2014). Im Vergleich zu den gesunden Kontrollprobanden war in den Messungen der HSP-Probanden eine schnellere Beendigung der Inaktivierung der K_s -Kanäle erkennbar. Vergleichbare Ergebnisse wurden bereits in Messungen von Probanden mit einer ALS detektiert. Diese sind durch eine reduzierte Aktivität der paranodalen K_f -Kanäle sowie eine verminderte nodale K_s -Leitfähigkeit erklärbar (Vucic und Kiernan 2006, Shibuta et al. 2013).

5.1.5 Zusammenschau der Veränderungen auf Ionenkanalebene

In der Zusammenschau der oben diskutierten Ergebnisse scheint in der HSP-Patientengruppe eine gesteigerte nodale Na_p -Leitfähigkeit bei reduzierter

internodaler K_s -Leitfähigkeit und verminderter paranodaler K_f -Kanal-Aktivität vorzuliegen. Zudem ergeben sich auch Hinweise auf eine erhöhte Einwärtsgleichrichteraktivität bei HSP-Patienten (Abb. 19).

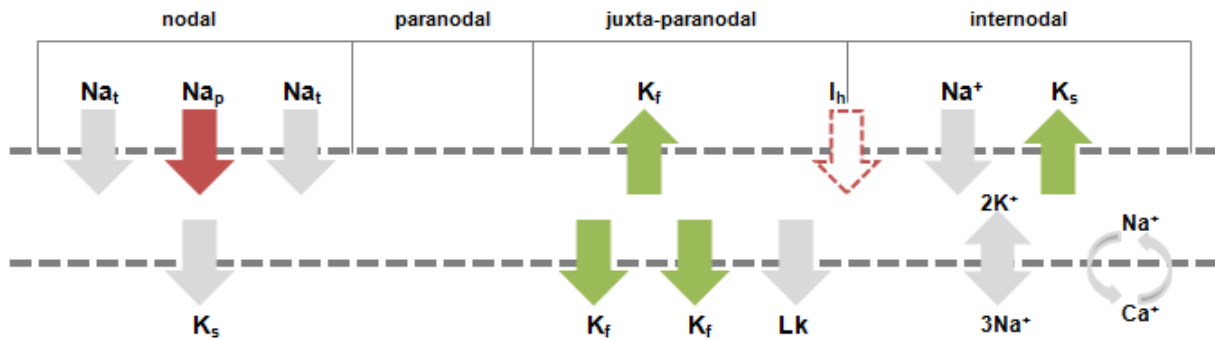


Abb. 19: Darstellung der erhobenen Veränderungen auf Ionenkanalebene modifiziert nach Huynh und Kiernan 2015) (rot = gesteigerte Leitfähigkeit/Aktivität, grün = verminderte Leitfähigkeit/Aktivität)

Auffällig sind insbesondere die Veränderungen von SPG4-positiven Probanden im Vergleich zu SPG4-negativen HSP-Probanden. Die hier erkennbaren Veränderungen spiegeln sich auch im Gesamtvergleich aller HSP-Probanden gegen die gesunden Kontrollpersonen sowie, in geringerer Ausprägung, der SPG4-negativen Probanden gegen gesunde Kontrollpersonen wider. Die vorliegenden Ergebnisse sind in Anbetracht der bekannten phäno- und genotypischen Variabilität bei HSP als vorwiegend SPG4-typische Veränderungen beziehungsweise überwiegend SPG4-vermittelte Effekte zu diskutieren. Es ist zu überlegen, ob es bei der SPG4-HSP zu stärker ausgeprägten Veränderungen der axonalen Erregbarkeit peripherer Nerven kommt, als bei anderen Mutationen.

5.2 Korrelation mit der Krankheitsschwere

Zwischen der Krankheitsschwere, dargestellt durch den SPRS, und den erhobenen TT-Messwerten zeigte sich einzig eine signifikant negative Korrelation mit der Strength-duration time constant. In der Regressionsanalyse war diese ebenfalls objektivierbar. Die ermittelte negative Korrelation ist, unter Beachtung der geringen Gruppengröße, dadurch erklärbar, dass die bei der HSP auftretenden Symptome und die elektrophysiologischen Veränderungen durch eine Degeneration von Nervenfasern zustande kommen. Somit ist im Verlauf, mit zunehmender

Krankheitsschwere, die Reduktion der Messwerte als Ausdruck dieses Abbauprozesses anzusehen. Aufgrund der langsamen Degeneration sind bei HSP-Patienten mit geringer subjektiver Beeinträchtigung und leichtem klinischen Bild auch elektrophysiologische Veränderungen zunächst nur gering ausgeprägt und nehmen im Verlauf zu.

5.3 Diskussion der Methodik und Limitierungen

An der Studie nahmen insgesamt 30 Probanden und 27 gesunde Kontroll-Patienten teil. Aufgrund technischer Schwierigkeiten während der Messung oder dem Abbruch durch Teilnehmer mussten 4 Probanden und 6 Kontrollen ausgeschlossen werden. Die weiblichen Probanden waren im Mittel 10,67 Jahre älter als die weiblichen Kontrollen; die männlichen Probanden waren 4,61 Jahre älter als die gleichgeschlechtlichen Kontrollen. Ein Einfluss des Alters auf die Erregbarkeit der Axonmembran ist bekannt. Insbesondere sinkt die CMAP-Amplitude aufgrund des Verlustes motorischer Einheiten. Eine Erhöhung der TSD, reduzierte Schwellenwertveränderungen auf einen depolarisierenden Reiz sowie eine reduzierte Supernormality sind beschrieben. Zudem scheint bei steigendem Alter eine Tendenz zur erniedrigten axonalen Erregbarkeit der Membran zu bestehen, welche in einer Reduktion der Accomodation half-time zum Ausdruck kommt (Jankelowitz et al. 2007, Casanova et al. 2014). Schlussendlich ist zudem ein Effekt des Geschlechtes auf die Eigenschaften der axonalen Membran bekannt. Aufgrund von Unterschieden in den K_v -induzierten Eigenschaften (late Subexcitability, Accomodation half-time, threshold undershoot nach depolarisierenden Strömen) wird ein niedrigerer Schwellenwert bei Frauen angenommen (Casanova et al. 2014). Hinsichtlich der Unterschiede in der Geschlechts- und Altersverteilung zwischen Probanden- und Kontrollen erfolgte deshalb die Geschlechts- und Alterskompensation mit Hilfe von QtracP®. Somit war ein direkter Vergleich der beiden Gruppen ohne Einbeziehung möglicher beeinflussender Faktoren möglich.

Die Hauttemperatur während der Messung betrug trotz wärmender Maßnahmen in der Probandengruppe 31,55°C (SD 0,69), in der Kontrollgruppe 32,79°C (SD 0,82). Unter den weiblichen Studienteilnehmer bestand zwischen der Probanden- (31,38°C) und der Kontrollgruppe (32,51°C) eine Temperaturdifferenz von 1,13°C. Zwischen

der männlichen Probanden- (31,70°C) und Kontrollgruppe (33,00°C) bestand eine Temperaturdifferenz von 1,30°C. Vorangegangene Studien zeigen einen vorhandenen, jedoch geringeren Effekt der Hauttemperatur auf die Erregbarkeit motorischer Axone als bei der Messung der Nervenleitgeschwindigkeit (Kiernan et al. 2001). Eine reduzierte Hauttemperatur begünstigt, insbesondere durch die kälteinduzierte Trägheit der K_s -Kanäle, eine Verlängerung der Accomodation half-time (Kiernan et al. 2001, Casanova et al. 2014). Auch die RRP zählt zu den temperatursensiblen Parametern. Die Induktion einer hohen Refraktärzeit durch eine niedrige Temperatur aufgrund einer verzögerten Rückbildung der Inaktivierung der Na^+ -Kanäle ist beschrieben (Burke et al. 2001). Auch eine erhöhte Latency kann durch erniedrigte Messtemperaturen induziert sein. Hierbei spielt insbesondere ein kälteassoziiertes verlangsamtes Gating der Na^+ -Kanäle und ein daraus resultierender verlangsamter Na^+ -Einstrom in die Zelle eine entscheidende Rolle. Zudem ist wiederholt ein Zusammenhang zwischen niedriger Temperatur, erhöhter TSD, erhöhter TEd und erniedrigter Subexcitability (%) jedoch ohne Signifikanz beschrieben (Kiernan et al. 2001). Um diese bekannten Effekte im Rahmen der Datenauswertung zu vermeiden, erfolgte die Temperaturkompensation mittels QtracP®.

Die statistische Auswertung begann automatisiert mit einer Prüfung auf eine Normalverteilung mittels Lilliefors-Test in QtracP®. Der Gruppenvergleich erfolgte danach entsprechend der Ergebnisse des Normalitätstests mittels unpaired t-Test oder Mann-Whitney-U-Test. Zwar ist der Lilliefors-Test aufgrund seiner geringen Teststärke für kleinere Stichproben zur Testung der Normalität im Vergleich zu anderen Testmethoden weniger geeignet, aber es wurden alle bisherigen Studien zur axonalen Erregbarkeit peripherer Nerven mit QtracP® statistisch beurteilt. Um eine Vergleichbarkeit der im Rahmen dieser Studie erhobenen Daten mit anderen durch TT erhobenen Daten zu gewährleisten, wurde trotz dieses Kritikpunktes QtracP® genutzt.

Da Unterschiede in der axonalen Erregbarkeit verschiedener peripherer Nerven bekannt sind, wurden im Sinne der Vergleichbarkeit der Ergebnisse alle aufgeführten Daten von motorischen Messungen des N. medianus erhoben (Vucic und Kiernan 2006, Kumar et al. 2012, Shibuta et al. 2013).

In dieser Arbeit wurden die Veränderungen bei SPG4-positiven Probanden mit denen der anderen Patienten im Speziellen verglichen. Weitere Subgruppenvergleiche, zum Beispiel mit SPG7-positiven Patienten, waren, aufgrund der geringen Kohortengröße, in dieser Studie nicht möglich.

6. Schlussfolgerung

Ziel dieser Arbeit war es, die subklinischen, axonalen Prozesse der HSP an peripheren Nerven darzustellen. Es konnten eine Dysfunktion des N. medianus bei den HSP-Probanden nachgewiesen und die Veränderungen der axonalen Erregbarkeit peripherer Nerven auf Ionenkanalebene genauer beschrieben werden.

Durch die langsam progrediente axonale Degeneration mit konsekutiver Veränderung der Nerven geometrie scheint es zu einer gesteigerten nodale Na_p -Leitfähigkeit und somit auch zu einer gesteigerten Erregbarkeit als Reaktion auf einen depolarisierenden Reiz zu kommen. Zudem ist eine Reduktion der internodalen K_s -Leitfähigkeit und paranodaler K_f -Kanal-Aktivität erkennbar, welche zu einer gesteigerten Erregbarkeit nach Beendigung der Refraktärzeit sowie einer verminderten untererregbaren Phase der Axonmembran führen.

Ein Großteil der erhobenen Veränderungen der axonalen Erregbarkeit scheint durch die SPG4-positiven Probanden verursacht beziehungsweise verstärkt zu sein, da bei ihnen diese, auch im direkten Vergleich mit den SPG4-negativen Probanden, besonders deutlich ausgeprägt sind. In der SPG4-negativen Gruppe konnten gegenüber den gesunden Kontrollpersonen ebenso signifikante Veränderungen erhoben werden, welche eine gesteigerte nodale Na_p -Leitfähigkeit ebenso wie eine reduzierte internodale K_s -Leitfähigkeit und paranodale K_f -Aktivität nahe legen, jedoch sind diese insgesamt geringer ausgeprägt. Somit konnte in dieser Arbeit auch elektrophysiologisch die bereits bekannte Heterogenität der HSP dargestellt werden. Weitere Subgruppenvergleiche, zum Beispiel mit SPG7-HSP, waren in der vorliegenden Studie, aufgrund der geringen Kohortengröße, nicht möglich.

Zusammenfassend können die gefundenen Veränderungen die, bislang nur an einer kleinen Zahl von HSP-Patienten beschrieben, Ergebnisse von Kumar (Kumar et al. 2012) bestätigen, gehen jedoch über eine isolierte Erhöhung der TSD in der SPG4-Gruppe deutlich hinaus. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse Parallelen zur axonalen Erregbarkeit anderer Motoneuronerkrankungen, speziell der ALS. Die erhobenen Daten untermauern die Theorie, dass trotz der primären Affektion des ersten Motoneurons im Rahmen der selektiven Vulnerabilität der Pyramidenbahn bei der HSP auch Veränderungen der peripheren Nerven bestehen, welche sich, im Gegensatz zur Klinik mit vorrangiger Beeinträchtigung der unteren Extremität, auch

in den Nerven der oberen Extremität nachweisen lassen. Mittels der bereits vielfach als geeignet bewährten Messmethode des TT konnte in dieser Arbeit ein tieferer Einblick in die axonalen Veränderungen gewonnen werden und vorbestehende Erkenntnisse erweitert werden.

Perspektivisch erscheinen Untersuchungen einer größeren Kohorte mit Schwerpunkt auf einem Vergleich der axonalen Erregbarkeitsveränderungen verschiedener HSP-assoziiierter Mutationen sinnvoll, um eine mögliche elektrophysiologische Variabilität begleitend zur bereits bekannten geno- und phänotypischen Variabilität der HSP zu detektieren. Derartige weiterführende Studien könnten zu einem besseren Verständnis der molekulargenetischen Veränderungen der HSP und somit perspektivisch zur Entwicklung therapeutischer Optionen entsprechend der speziellen zugrunde liegenden Pathologie beitragen. Des Weiteren erscheint eine Latent-addition-Messung, basierend auf Threshold-Tracking-Techniken, in einem vergleichbaren Kollektiv sinnvoll, um das Verständnis der nodalen Natriumleitfähigkeit, speziell der Na_p -Leitfähigkeit, bei der HSP zu vertiefen. Auch eine Beurteilung der Quantität und Effektivität motorischer Einheiten (visualisierbar mittels Techniken wie MUNIX oder MScan) ist für ein umfassendes Verständnis der Pathophysiologie der HSP zu diskutieren.

7. Literaturverzeichnis

- Aulitzky A, Friedrich K, Gläser D, Gastl R, Kubisch C, Ludolph AC, Volk AE, 2014. A complex form of hereditary spastic paraplegia in three siblings due to somatic mosaicism for a novel SPAST mutation in the mother. *J Neurol Sci*, 347(1-2):352-5
- Baker MD, Bostock H, 1997. Low-threshold, persistent sodium current in rat large dorsal root ganglion neurons in culture. *J Neurophysiol*, 77(3):1503-13
- Baker MD, Bostock H, 1999. The pH dependence of late sodium current in large sensory neurons. *Neuroscience*, 92(3):1119-30
- Barrett EF, Barrett JN, 1982. Intracellular recording from vertebrate myelinated axons: mechanism of the depolarizing afterpotential. *J Physiol*, 323:117-44
- Beetz C, Nygren AO, Schickel J, Auer-Grumbach M, Bürk H, Heide G, Kassubek J, Klimpe S, Klopstock T, Kreuz F, Otto S, Schüle R, Schöls L, Sperfeld AD, Witte OW, Deufel T, 2006. High frequency of partial SPAST deletions in autosomal dominant hereditary spastic paraplegia. *Neurology*, 67(11):1926-30
- Blackstone C, 2012. Cellular pathways of hereditary spastic paraplegia. *Annu Rev Neurosci*, 35:25-47
- Bostock H, Cikurel K, Burke D, 1998. Threshold tracking techniques in the study of human peripheral nerve. *Muscle Nerve*, 21(2):137-58
- Botzolakis EJ, Zhao J, Gurba KN, Macdonald RL, Hedera P, 2011. The effect of HSP-causing mutations in SPG3A and NIPA1 on the assembly, trafficking and interaction between atlastin-1 and NIPA1. *Mol Cell Neurosci*, 46(1):122-35
- Braschinsky M, Luus SM, Gross-Paju K, Haldre S, 2009. The prevalence of hereditary spastic paraplegia and the occurrence of SPG4 mutations in Estonia. *Neuroepidemiology*, 32(2):89-93
- Burke D, Kiernan MC, Bostock H, 2001. Excitability of human axons. *Clin Neurophysiol*, 112(9):1575-85
- Caldwell JH, Schaller KL, Lasher RS, Peles E, Levinson SR, 2000. Sodium channel Na(v)1.6 is localized at nodes of ranvier, dendrites and synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(10):5616-20
- Catterall WA, Goldin AL, Waxman AG, 2005. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol Rev*, 57(4):397-409
- Coriat R, Alexandre J, Nicco C, Quinquis L, Benoit E, Chéreau C, Lemaréchal H, Mir O, Borderie D, Tréluyer JM, Weill B, Coste J, Goldwasser F, Batteux F, 2014. Treatment of oxaliplatin-induced peripheral neuropathy by intravenous mangafodipir. *J Clin Invest*, 124(1):262-72
- Daoud H, Zhou S, Noreau A, Sabbagh M, Belzil V, Dionne-Laporte A, Tranchant C, Dion P, Rouleau GA, 2012. Exome sequencing reveals SPG11 mutations causing juvenile ALS. *Neurobiol Aging*, 33(4):839.e5-9

- Daoud H, Papadima EM, Ouled Amar Bencheikh B, Katsila T, Dionne-Laporte A, Spiegelman D, Dion PA, Patrinos GP, Orrù S, Rouleau GA, 2015. Identification of a novel homozygous SPG7 mutation by whole exome sequencing in a greek family with a complicated form of hereditary spastic paraplegia. *Eur J Genet*, 58(11):573-7
- Dong EL, Wang C, Wu S, Lu YQ, Lin XH, Su HZ, Zhao M, He J, Ma LX, Wang N, Chen WJ, Lin X, 2018. Clinical spectrum and genetic landscape for hereditary spastic paraplegias in China. *Mol Neurodegener*, 13(1):36
- Erb W, 1877. Ueber die spastische Spinalparalyse (Tabes dorsales spasmodique Charcot). *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin*, 70(2):241-267
- Erb W, 1903. Ueber die spastische und syphilitische Spinalparalyse und ihre Existenzberechtigung. *Deutsche Zeitschrift für Nervenheilkunde*, 23(5):347-377
- Erichsen AK, Koht J, Stray-Pedersen A, Abdelnoor M, Tallaksen CM, 2009. Prevalence of hereditary ataxia and spastic paraplegia in southeast Norway: a population-based study. *Brain*, 132(Pt6):1577-88
- Estrada-Cuzcano A, Martin S, Chamova T, Synofzik M, Timmann D, Holemans T, Andreeva A, Reichbauer J, De Rycke R, Chang DI, van Veen S, Samuel J, Schöls L, Pöppel T, Møllerup Sørensen D, Asselbergh B, Klein C, Zuchner S, Jordanova A, Vangheluwe P, Tournev I, Schüle R, 2017. Loss-of-function mutations in the ATP13A2/PARK9 gene cause complicated hereditary spastic paraplegia (SPG78). *Brain*, 140(2):287-305
- Fink JK, 2013. Hereditary spastic paraplegia: clinic-pathologic features and emerging molecular mechanisms. *Acta Neuropathol*, 126(3):307-28
- Finsterer J, Löscher W, Quasthoff S, Wanschitz J, Auer-Grumbach M, Stevanin G, 2012. Hereditary spastic paraplegias with autosomal dominant, recessive, x-linked, or maternal trait of inheritance. *J Neurol Sci*, 318(1-2):1-18
- Goldin AL, Barchi RL, Caldwell JH, Hofmann F, Howe JR, Hunter JC, Kallen RG, Mandel G, Meisler MH, Netter YB, Noda M, Tamkun MM, Waxman SG, Wood JN, Catterall WA, 2000. Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron*, 28(2) :365-8
- Goldin AL, 2001. Resurgence of sodium channel research. *Annu Rev Physiol*, 63:871-94
- Graf JM, Claes C, Greiner W, Über A, 1998. Die deutsche Version des EuroQol-Fragebogens. *Zeitschrift für Gesundheitswissenschaften*, 6(1):3-20
- Grosskreutz J, 1999. Elektrophysiologische Eigenschaften unmyelinisierter Fasern des menschlichen Nervus suralis [Dissertation]. München: Technische Universität München
- Grosskreutz J, Lin C, Mogyoros I, Burke D, 1999. Changes in excitability indices of cutaneous afferents produced by ischaemia in human subjects. *J Physiol*, 518(Pt1) :301-14

- Grosskreutz J, Lin CS, Mogyoros I, Burke D, 2000. Ischaemic changes in refractoriness of human cutaneous afferents under threshold-clamp conditions. *J Physiol*, 523(Pt3):807-15
- Guidice Lo T, Lombardi F, Santorelli FM, Kawarai T, Orlacchio A, 2014. Hereditary spastic paraplegia: clinical-genetic characteristics and evolving molecular mechanisms. *Exp Neurol*, 261:518-39
- Hazan J, Fonknechten N, Mavel D, Paternotte C, Samson D, Artiguenave F, Davoine CS, Cruaud C, Dürr A, Wincker P, Brottier P, Cattolico L, Barbe V, Burgunder JM, Prud'homme JF, Brice A, Fontaine B, Heilig B, Weissenbach J, 1999. Spastin, a new AAA protein is altered in the most frequent form of autosomal dominant spastic paraplegia. *Nat Genet*, 23(3):296-303
- Howells J, Trevillion L, Bostock H, Burke D, 2012. The voltage dependence of I_h in human myelinated axons. *J Physiol*, 590.7:1625-1640
- Huynh W, Kiernan MC, 2015. Peripheral nerve axonal excitability studies: expanding the neurophysiologist's armamentarium. *Cerebellum & Ataxias*, 3;2:4. doi: 10.1186/s40673-015-0022-2
- Kiernan MC, Bostock H, 2000. Effects of membrane polarization and ischaemia on the excitability properties of human motor axons. *Brain*, 123(Pt12):2542-51
- Kiernan MC, Burke D, Andersen KV, Bostock H, 2000. Multiple measures of axonal excitability: a new approach in clinical testing. *Muscle Nerve*, 23(3):399-409
- Kiernan MC, Lin CS, Andersen KV, Murray NM, Bostock H, 2001. Clinical evaluation of excitability measures in sensory nerve. *Muscle Nerve*, 24(7):883-92
- Kiernan MC, Baker MD, Bostock H, 2003. Characteristics of late Na⁽⁺⁾ current in adult rat small sensory neurons. *Neuroscience*, 119(3):653-60
- Klimpe S, Schüle R, Kassubek J, Otto S, Kohl Z, Klebe S, Klopstock T, Ratzka S, Karle K, Schöls L, 2012. Disease severity affects quality of life of hereditary spastic paraplegia patients. *Eur J Neurol*, 19(1):168-71
- König HH, Bernert S, Angermeyer MC, 2005. Gesundheitszustand der deutschen Bevölkerung: Ergebnisse einer repräsentativen Befragung mit dem EuroQol-Instrument. *Gesundheitswesen*, 67(3):173-182
- Krishnan AV, Lin CS, Kiernan MC, 2005. Excitability differences in lower-limb motor axons during and after ischemia. *Muscle Nerve*, 31(2):205-13
- Krishnan AV, Lin CS, Park SB, Kiernan MC, 2009. Axonal ion channels from bench to bedside: a translational neuroscience perspective. *Prog Neurobiol*, 89(3):288-313
- Kumar KR, Sue CM, Burke D, Ng K, 2012. Peripheral neuropathy in hereditary spastic paraplegia due to spastin (SPG4) mutation – a neurophysiological study using excitability techniques. *Clin Neurophysiol*, 123(7):1454-9
- Kuwabara S, Misawa S, 2015. Acquired and genetic channelopathies: in vivo assessment of axonal excitability. *Exp Neurol*, 263:368-71

- López E, Casasnovas C, Giménez J, Matilla-Duenas A, Sánchez I, Volpini V, 2015. Characterization of Alu and recombination-associated motifs mediating a large homozygous SPG7 gene rearrangement causing hereditary spastic paraplegia. *Neurogenetics*, 16(2):97-105
- Magariello A, Muglia M, Patitucci A, Mazzei R, Conforti FL, Gabriele AL, Sprovieri T, Ungaro C, Gambardella A, Mancuso M, Siciliano G, Branca D, Aguglia U, de Angelis MV, Longo K, Quattrone A, 2006. Novel spastin (SPG4) mutations in Italian patients with hereditary spastic paraplegia. *Neuromuscul Disord*, 16(6): 387-90
- Magariello A, Muglia M, Patitucci A, Ungaro C, Mazzei R, Gabriele AL, Sprovieri T, Citrigno L, Conforti FL, Liguori M, Gambardella A, Bono F, Piccoli T, Patti F, Zappia M, Mancuso M, Iemolo F, Quattrone A, 2010. Mutation analysis of the SPG4 gene in Italian patients with pure and complicated forms of spastic paraplegia. *J Neurol Sci*, 288(1-2):96-100
- Mc Monagle P, Webb S, Hutchinson M, 2002. The prevalence of “pure” autosomal dominant hereditary spastic paraparesis in the island of Ireland. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 72(1):43-6
- Misawa S, Kuwabara S, Ogawara K, Kitano Y, Hattori T, 2005a. Strength-duration properties and glycemic control in human diabetic motor nerves. *Clin Neurophysiol*, 116(2):254-8
- Misawa S, Kuwabara S, Kanai K, Tamura N, Hiraga A, Nakata M, Ogawara K, Hattori T, 2005b. Axonal potassium conductance and glycemic control in human diabetic nerves. *Clin Neurophysiol*, 116(5):1181-7
- Mogyoros I, Kiernan MC, Burke D, 1996. Strength-duration properties of human peripheral nerve. *Brain*, 119(Pt2):439-47
- Mogyoros I, Kiernan MC, Burke D, Bostock H, 1997. Excitability changes in human sensory and motor axons during hyperventilation and ischaemia. *Brain*, 120(Pt2):317-25
- Müller-Esterl W, 2004. *Biochemie - Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*. 1. Auflage, München: Elsevier, Spektrum Akademischer Verlag
- Murray JE, Jankelowitz SK, 2011. A comparison of the excitability of motor axons innervating the APB and ADM muscles. *Clin Neurophysiol*, 122(11):2290-3
- Orsucci D, Petrucci L, Ienco EC, Chico L, Simi P, Fogli A, Baldinotti F, Simoncini C, LoGerfo A, Carlesi C, Arnoldi A, Bassi MT, Siciliano G, Bonuccelli U, Mancuso M, 2014. Hereditary spastic paraparesis in adults. A clinical and genetic perspective from Tuscany. *Clin Neurol Neurosurg*, 120:14-9
- Pape HC, 1996. Queer current and peacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons. *Annu Rev Physiol*, 58:299-327
- Proukakis C, Moore D, Labrum R, Wood NW, Houlden H, 2011. Detection of novel mutations and review of published data suggests that hereditary spastic paraplegia caused by spastin (SPAST) mutations is found more often in males. *J Neurol Sci*, 306(1-2):62-5

- Raymond SA, 1979. Effects of nerve impulses on threshold of frog sciatic nerve fibres. *J Physiol*, 290(2):273-303
- Reid E, 1997. Pure hereditary spastic paraplegia. *J Med Genet*, 34(6):499-503
- Reid G, Scholz A, Bostock H, Vogel W, 1999. Human axons contain at least five types of voltage-dependent potassium channel. *J Physiol*, 518(Pt3):681-96
- Ruano L, Melo C, Silva MC, Coutinho P, 2014. The global epidemiology of hereditary ataxia and spastic paraplegia: a systematic review of prevalence studies. *Neuroepidemiology*, 42(3):174-83
- Salinas S, Proukakis C, Warner TT, 2008. Hereditary spastic paraplegia: clinical features and pathogenetic mechanisms. *Lancet Neurol*, 7(12):1127-38
- Schmidt RF, Schaible HG, 2006. *Neuro- und Sinnesphysiologie*. 5. Auflage, Heidelberg: Springer Medizin Verlag
- Schüle R, Holland-Letz T, Klimpe S, Kassubek J, Klopstock T, Mall V, Otto S, Winner B, Schöls L, 2006. The Spastic Paraplegia Rating Scale (SPRS): a reliable and valid measure of disease severity. *Neurology*, 67(3):430-4
- Silva MC, Coutinho P, Pinheiro CD, Neves JM, Serrano P, 1997. Hereditary ataxias and spastic paraplegias: methodological aspects of a prevalence study in Portugal. *J Clin Epidemiol*, 50(12):1377-84
- Solowska JM, Baas PW, 2015. Hereditary spastic paraplegia SPG4: what is known and not known about the disease. *Brain*, 138(Pt9):2471-84
- Stevanin G, Azzedine H, Denora P, Boukhris A, Tazir M, Lossos A, Rosa AL, Lerer I, Hamri A, Alegria P, Loureiro J, Tada M, Hannequin D, Anheim M, Goizet C, Gonzalez-Martinez V, Le Ber I, Florlani S, Iwabuchi K, Meiner V, Uyanik G, Erichsen AK, Feki I, Pasquier F, Belarbi S, Cruz VT, Depienne C, Truchetto J, Garrigues G, Tallaksen C, Tranchant C, Nishizawa M, Vale J, Coutinho P, Santorelli FM, Mhiri C, Brice A, Durr A, SPATAX consortium, 2008. Mutations in SPG11 are frequent in autosomal recessive spastic paraplegia with thin corpus callosum, cognitive decline and lower motor neuron degeneration. *Brain*, 131(Pt3):772-84
- Tesson C, Koht J, Stevanin G, 2015. Delving into the complexity of hereditary spastic paraplegias: how unexpected phenotypes and inheritance modes are revolutionizing their nosology. *Hum Genet*, 134(6):511-38
- Trepel M, 2008. *Neuroanatomie: Struktur und Funktion*. 4. Auflage, München, Jena: Elsevier, Urban & Fischer-Verlag
- Wang K, Zhao G, 2015. Exon 8-17 deletions of SPAST in a Chinese family with hereditary spastic paraplegia: a case report and literature review. *J Neurol Sci*, 357(1-2):282-4
- Weiss G, 1901. Sur la possibilité de rendre comparable entre eux les appareils servant à l'excitation électrique. *ArchItalBiol*, 35 :413-446
- Yoon G, Baskin B, Tarnopolsky M, Boycott KM, Geraghty MT, Sell E, Goobie S, Meschino W, Banwell B, Ray PN, 2013. *Neurogenetics*, 14(3-4):181-8



8. Anhang

8.1 Studienunterlagen

8.1.1 Teilnehmerinformation und Aufklärung

Hans-Berger-Klinik für Neurologie

Direktor: Prof. Dr. med. Otto W. Witte

Erlanger Allee 101
07747 Jena

Tel. 03641 932 3401
Fax 03641 932 3402

E-mail: otto.witte@med.uni-jena.de
Internet: www.neuro.uniklinikum-jena.de

Studienleiter: julian.grosskreutz@med.uni-jena.de

Probandenaufklärung

Studie – Erregbarkeit des peripheren Nerven bei Hereditärer Spastischer Spinalparalyse

Sehr geehrte Probandin, sehr geehrter Proband,

dieser Bogen soll dazu dienen Sie über das folgende Experiment zu informieren.

Ziel der Studie

Bei dieser Studie soll mittels einer elektrophysiologischen Messmethode, dem „threshold tracking“, die Erregbarkeit der Nerven bei Menschen Hereditärer Spastischer Spinalparalyse (HSP) untersucht werden.

Das Experiment

In diesem Experiment sollen Veränderungen in der Erregbarkeit von Nerven bei Menschen mit HSP nachgewiesen werden. Dazu wird an einem Nerv des Armes und an einem Nerv des Beines eine Nervenmessung durchgeführt. Diese Messungen erfolgen mittels „threshold tracking“, einer etablierten, nichtinvasiven, computergesteuerten Messmethode. Die Messungen beider Nerven erfolgen nacheinander.

Die Dauer des Experimentes wird sich mit Vorbereitung auf circa 90 Minuten belaufen.

Die Messung („threshold tracking“)

Für die Nervenmessung werden je vier selbstklebende Elektroden (zwei Stimulationselektroden am Unterarm/Unterschenkel, zwei Ableitelektroden am kleinen Finger/Fuß) und eine kochsalzgetränkte Erdungselektrode an Ihrem Arm beziehungsweise Bein befestigt. Stimuliert wird zum einen der Nervus ulnaris – der Ellenerv, welcher die kleine Handmuskulatur und Muskeln zur Beugung im Handgelenk motorisch (Muskelbewegung) und den äußeren Teil der Hand (kleiner Finger, Ringfinger) sensibel (Empfinden) versorgt. Die Befestigung der Elektroden kann Abbildung 1 entnommen werden. Zum anderen wird der Nervus tibialis, der Schienbeinnerv, stimuliert (s. Abbildung 2). Dieser Nerv versorgt große Bereiche des Beines motorisch und sensibel. Die Stimulation des Nerven erfolgt durch Strompulse, deren Stärke auf maximal +/- 50 mA Stromstärke und +/- 100 V elektrische Spannung begrenzt ist, über die Stimulationselektroden. Die notwendige Stromstärke ist für jeden Menschen verschieden, liegt jedoch bei den meisten Patienten um 10 mA. Durch die Stromimpulse wird der kleine Finger bzw. der große Zeh zucken. Über die beiden Ableitelektroden am kleinen Finger bzw. Fuß wird dieses Zucken, das die motorische Antwort auf die Erregung des Nerven darstellt, durch den Computer aufgezeichnet.



Abb.1



Abb.2

Zu Beginn werden verschiedene Eigenschaften des Nervs, die bei jedem Probanden unterschiedlich sind, getestet. Zum Beispiel ab welcher Stromstärke sich die Reizantwort (also das Zucken) nicht mehr verstärken lässt, oder ab welcher Stromstärke überhaupt eine Antwort auslösbar ist. Anschließend durchläuft der Computer ein Programm mit verschiedenen Reizanordnungen, um weitere Eigenschaften des Nervs zu testen.

Um eine Verfälschung der Werte auszuschließen, ist es wichtig, dass die Hauttemperatur nicht zu niedrig ist. Deshalb wird der Arm bzw. das Bein eventuell in einer Decke warm gehalten.

Diese Messung der nervlichen Erregbarkeit mit „threshold tracking“ wird je Nerv circa 15 Minuten dauern. Durch die Stromimpulse kommt es zu leichten Schmerzen, selten können Hautreizungen auftreten.

Für die gesamte Zeit der Messung gilt, dass bei vermehrt auftretenden Schmerzen das Gerät über einen „Notschalter“ jederzeit ausgeschaltet werden kann. Auch verfügt das Gerät über eine automatische Ausschaltung, welche bei gefährlicher Strommenge den Stromfluss sofort abschaltet. Im Laufe des geplanten Experiments sind jedoch keine höheren Strommengen oder stärkere Schmerzen zu erwarten.

Risiken und Komplikationen

Threshold tracking: Schmerzen während der Untersuchung durch Stromimpulse, Hautreizungen an der Elektrodenklebestelle

Die Teilnahme am Experiment erfolgt freiwillig! Sie können jederzeit und ohne Angabe von Gründen ihre Zustimmung zurückziehen oder das Experiment abbrechen.

Vielen Dank für ihre Teilnahme.

Ort, Datum, Unterschrift des Probanden

Ort, Datum, Unterschrift des Untersuchers



**Hans-Berger-Klinik für
Neurologie**

Direktor: Prof. Dr. med. Otto W. Witte

Erlanger Allee 101
07747 Jena

Tel. 03641 932 3401
Fax 03641 932 3402

E-mail: otto.witte@med.uni-jena.de
Internet: www.neuro.uniklinikum-jena.de

Studienleiter: julian.grosskreutz@med.uni-jena.de

Einwilligungserklärung

**zur Studie:
Erregbarkeit des peripheren Nervs bei Hereditärer Spastischer Spinalparalyse**

Ich bin ausführlich über Sinn, Ablauf und Nutzen der geplanten elektrophysiologischen Untersuchung im Rahmen einer wissenschaftlichen Studie informiert worden. Auch habe ich das entsprechende Informationsblatt gelesen und konnte alle für mich wichtigen Fragen klären. Über mögliche Nebenwirkungen und Risiken bin ich mit ausreichender Bedenkzeit aufgeklärt worden. Mir ist bewusst, dass durch die Untersuchung leichte Schmerzen auftreten können, technisch jedoch ein Schaden durch die Konstruktion des Stimulationsgerätes verhindert wird. Ich weiß, dass ich die Studie jederzeit ohne Angabe von Gründen abbrechen und meine Einwilligung widerrufen kann.

Mir ist bekannt, dass die bei der Untersuchung gewonnen Daten auf Basis der elektronischen Datenverarbeitung in pseudonymisierter Form weiterverarbeitet und eventuell für wissenschaftliche Veröffentlichungen verwendet werden sollen. Ich erkläre mich hiermit mit der Verarbeitung, Weitergabe an zur Verschwiegenheit verpflichtete Beauftragte und Veröffentlichung der Daten in anonymisierter Form einverstanden. Die Bearbeitung der Daten erfolgt ausschließlich zu statistischen und wissenschaftlichen Zwecken.

Ich erkläre hiermit, dass ich mit der Teilnahme an der Studie einverstanden bin.

Ort, Datum und Unterschrift des Probanden

Ort, Datum und Unterschrift des Untersuchers

8.2 Fragebögen

8.2.1 Fragebogen für Teilnehmer

Fragebogen zur Studie: Erregbarkeit des peripheren Nerven bei Hereditärer Spastischer Spinalparalyse

Name:.....

Vorname:.....Geschlecht:.....Geburtsdatum:.....

Straße:.....

Wohnort:.....Telefon:.....

Beruf:.....

Beantworten Sie bitte folgende Fragen vor Teilnahme an den Untersuchungen (Zutreffendes unterstreichen):

Nehmen Sie regelmäßig Medikamente ein (auch die "Pille")	ja	nein
Falls ja, welche?	<hr/>	

Sind Sie Raucher?	ja	nein
Wenn ja: Wieviele Zigaretten rauchen Sie täglich?	<hr/>	
Seit wievielen Jahren rauchen Sie?	<hr/>	

Trinken Sie Alkohol?	ja	nein
Wenn ja: Wie oft in der Woche trinken Sie Alkohol?	<hr/>	

Leiden Sie an einer chronischen Krankheit wie z.B. Diabetes, Bluthochdruck, Fettstoffwechselstörung, Tumorleiden ...?	ja	weiß nicht	nein
Wenn ja: Welche chronische Krankheit?	<hr/>		

Tragen Sie ein implantiertes elektrisches Gerät (Herzschrittmacher, Defibrillator, etc.)?	ja	nein
---	----	------

Hatten Sie schon einmal eine Bestrahlung oder Chemotherapie?	ja	nein
--	----	------

Könnten Sie schwanger sein, oder stillen Sie derzeit?	ja	weiß nicht	nein
---	----	------------	------

Sind bei Ihnen Allergien bekannt?	ja	weiß nicht	nein
Wenn ja: Welche?	<hr/>		

Haben Sie bereits eine humangenetische Untersuchung auf mögliche Ursachen Ihrer Erkrankung durchführen lassen?	ja	nein
Wenn ja: Mit welchem Ergebnis?	<hr/>	

Ist die Erkrankung auch bei Familienmitgliedern aufgetreten?	ja	weiß nicht	nein
Wenn ja: Wer?	<hr/>		

Was war das erste Symptom Ihrer Erkrankung?	<hr/>		
Wann wurde es erstmalig als HSP erkannt?	<hr/>		
	<hr/>		

8.2.2 Spastic Paraplegia Rating Scale

Hereditary Spastic Paraplegia Rating Scale

Pat-ID: _____
Untersucher: _____
Datum: _____

A: funktionelle Tätigkeiten

A1) Gehstrecke ohne Pause, Gehhilfen erlaubt

- 0: normal, keine Einschränkungen
- 1: ungewöhnliche Erschöpfung durch die Spastik nach einer Gehstrecke von >500m
- 2: Gehstrecke <500m
- 3: Gehstrecke <10m
- 4: Gehen nicht möglich

A2) Gang-Qualität, so schnell es geht 10 m laufen(rennen) mit Wendung

- 0: normal
- 1: leichte Steifheit der Beine, rennen aber möglich
- 2: deutlich spastischer Gang, störend beim rennen
- 3: Spastik erfordert den Gebrauch von Gehhilfen
- 4: 10m-Gehstrecke auch mit maximaler Unterstützung nicht möglich

A3) maximale Gehgeschwindigkeit (benötigte Zeit für eine 10m-Strecke) _____ sec

- 0: normal
- 1: leicht reduziert (> 5sec)
- 2: mäßig reduziert (> 10sec)
- 3: deutlich reduziert (> 20sec)
- 4: > 40sec oder Gehstrecke von 10m nicht möglich

A4) Treppensteigen (5 Stufen nach oben- Wendung- 5 Stufen nach unten)

- 0: normal, keine Hilfe benötigt
- 1: leichte Beeinträchtigung, Treppengeländer wird zwischendurch benötigt
- 2: mäßige Beeinträchtigung, Geländer wird dauerhaft benötigt
- 3: deutliche Beeinträchtigung, Hilfe einer anderen Person oder Gehhilfen benötigt
- 4: Treppensteigen nicht möglich

A5) Geschwindigkeit beim Treppensteigen (5 Stufen nach oben- Wendung- 5 Stufen nach unten) _____ sec

- 0: normal
- 1: leicht reduziert (> 5sec)
- 2: mäßig reduziert (> 10sec)
- 3: deutlich reduziert (> 20sec)
- 4: Treppensteigen nicht möglich

A6) Aufstehen von einem Stuhl (Arme auf der Brust verschränkt)

- 0: normal
- 1: langsam, oder mehr als ein Versuch nötig
- 2: Aufstützen auf die Arme erforderlich

- 3: Tendenz zurück zu fallen, doch aufstehen ohne Hilfe möglich
- 4: Aufstehen von einem Stuhl allein nicht möglich

B: Spastik und Schwäche

B1) Spastik- Hüftadduktoren

- 0: kein erhöhter Muskeltonus
- 1: leicht erhöhter Muskeltonus, „catch and release“
- 2: mäßig erhöhter Muskeltonus bei den meisten Bewegungen
- 3: beträchtlich erhöhter Muskeltonus, passive Bewegungen erschwert
- 4: Gliedmaßen steif in Adduktion

B2) Spastik- Knieflexoren

- 0: kein erhöhter Muskeltonus
- 1: leicht erhöhter Muskeltonus, „catch and release“
- 2: mäßig erhöhter Muskeltonus bei den meisten Bewegungen
- 3: beträchtlich erhöhter Muskeltonus, passive Bewegungen erschwert
- 4: Gliedmaßen steif in Adduktion

B3) Schwäche- Hüftadduktoren

- 0: keine Schwäche 5/5
- 1: leichte Schwäche 4/5
- 2: mäßige Schwäche 3/5
- 3: deutliche Schwäche 1-2/5
- 4: Plegie 0/5

B4) Schwäche- Fuß-Dorsalextension

- 0: keine Schwäche 5/5
- 1: leichte Schwäche 4/5
- 2: mäßige Schwäche 3/5
- 3: deutliche Schwäche 1-2/5
- 4: Plegie 0/5

C: Weitere Symptome

C1) Kontrakturen der Unteren Extremitäten

- Hüftextension: LWS und Oberschenkel berühren Unterlage
- Hüftabduktion: Winkel $>60^\circ$ zwischen Oberschenkeln
- Knieextension: Ober- und Unterschenkel berühren die Unterlage
- Sprunggelenk Dorsalextension und Pronation jeweils $>10^\circ$
- 0: keine Kontrakturen
- 1: leichte Kontrakturen, keine abnorme Gelenkfixation
- 2: fixierte Kontraktur an einem Gelenk
- 3: fixierte Kontraktur an zwei Gelenken
- 4: fixierte Kontraktur an mehr als zwei Gelenken

C2) Schmerz durch HSP-bedingte Symptome

- 0: kein Schmerz
- 1: $<50\%$ der Gehzeit am Tag Schmerz vorhanden, Intensität 1-3/10
- 2: $<50\%$ der Gehzeit am Tag Schmerz vorhanden, Intensität 4-10/10
- 3: $>50\%$ der Gehzeit am Tag Schmerz vorhanden, Intensität 1-3/10

4: >50% der Gehzeit am Tag Schmerz vorhanden, Intensität 4-10/10

C3) Blasen- & Mastdarmfunktion

0: normal

1: Harn- oder Stuhldrang (Schwierigkeiten , die Toilette schnell genug zu erreichen)

2: selten oder geringgradige Dranginkontinenz

3: mäßige Dranginkontinenz (Windel oder Katheter nötig, wenn außer Haus)

4: Dauerkatheter oder –Windel nötig

D: Liste komplizierender Symptome

Symptom	0= normal	1= Symptom vorhanden	Nicht eruierbar	Kommentar
Mentale Retardierung				
Demenz				
Psychose				
Epilepsie				
Visusverlust				
Katarakt				
Nystagmus				
Dysarthrie				
Dysphagie				
Standataxie				
Gangataxie				
Extrapyramidale Zeichen				
Muskelschwund obere Extremität				
Muskelschwund untere Extremität				
MER ↓ (welche?)				
Berührungssinn eingeschränkt				
Spitz-Stumpf eingeschränkt				
Vibrationssinn eingeschränkt				
Propriozeption eingeschränkt				
Haut-Veränderungen				
Skelett-Veränderungen				
Andere				

Danksagung

Mein Dank gilt allen, die zur Entstehung und Vollendung dieser Arbeit beigetragen haben.

Bedanken möchte ich mich speziell bei meinen Betreuern, PD Dr. med. Julian Grosskreutz und PD Dr. med. Tino Prell, für die Heranführung an dieses Dissertationsthema und das Näherbringen elektrophysiologischer Methoden. Durch beständige konstruktive Diskussionen und wertvolle Anregungen standen sie mir stets hilfreich zur Seite.

Mein besonderer Dank gilt neben meiner Familie für die tatkräftige Unterstützung, wiederholte liebevolle Anstöße und Motivation in unproduktiven Zeiten auch Dr. med. Dirk Brämer für seine Ratschläge, unermüdliche Geduld und zahlreichen Formatierungshilfen. Sie haben am Abschluss dieser Arbeit einen großen Anteil.

Zuletzt möchte ich mich bei allen Probanden bedanken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Insbesondere möchte ich hier die weit über das gewöhnliche Maß hinaus gehende Unterstützung durch die „HSP Selbsthilfegruppe Deutschland e.V.“ erwähnen, durch welche erst der Kontakt zu vielen HSPlern und ihren Familien möglich war. Ich danke allen Betroffenen und den Kontrollprobanden für die große Bereitschaft zur Teilnahme an den Messungen und wünsche ihnen alles Gute.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

- PD Dr. med. Julian Grosskreutz
- PD Dr. med. Tino Prell,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.